

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. H. B. Wuermeling

Deskriptive statistische Analyse
des Reaktionsablaufes der Cholinesterasehemmung
in menschlichem Serum nach Zugabe
von Diisopropylfluorophosphat (DFP)

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Franz Günter Harlander
aus 
Burghausen

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. H. B. Wuermeling

Deskriptive statistische Analyse
des Reaktionsablaufes der Cholinesterasehemmung
in menschlichem Serum nach Zugabe
von Diisopropylfluorophosphat (DFP)

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Franz Günter Harlander
aus
Burghausen

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher - v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 6. 1981

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	Seite
I. Diisopropylfluorophosphat (DFP)	1
1. Entdeckung, Verwendung und Gift- wirkung	1
2. Reaktionsmöglichkeiten des Diisopropyl- fluorophosphats im menschlichen Organismus	6
a) Spontane Hydrolyse	7
b) Enzymatische Hydrolyse	8
c) Proteinbindung	9
3. Irreversible Enzymblockade durch DFP	10
a) Theorie Nr. 1: Alterungsprozeß als Veränderung der räumlichen Enzymstruktur (MOON et al. (1965))	11
b) Theorie Nr. 2: Alterungsprozeß als Ergebnis der Wanderung des DIP vom primären Reaktionspartner zu einem nicht N-terminalen Serin- rest im aktiven Zentrum des En- zyms (WOOTON et al. (1960), NEURATH (1965), MOUNTER et al. (1957))	13
c) Theorie Nr. 3: Alterungsprozeß als	14

Ergebnis der Abspaltung einer
Isopropylgruppe vom DIP-Enzym-
Komplex (BEHRENDT et al. (1959)
und JANSZ et al. (1959))

4. Pharmakologische Eigenschaften des DFP	15
a) Hemmung der Cholinesterase (ChE) durch DFP	15
II. Diisopropylphosphat-ase (DFP-ase)	16
1. Reaktionsweise der DFP-ase	16
2. Enzymatische Eigenschaften der DFP-ase	18
3. Vorkommen der DFP-ase beim Menschen	18
4. DFP-ase im menschlichen Serum	19
B. Problemstellung, Untersuchungsmaterial und verwendete Meßmethoden	23
1. Problemstellung	23
2. Untersuchungsmaterial	25
3. Meßmethoden	29
4. Gewinnung des Serums	31
5. Anti-ChE-Technik zur Bestimmung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP mit der Methode nach GREINER (1980)	31
a) Meßapparatur	31

	Seite
b) Inkubation mit DFP	32
c) Messung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP	33
6. Anti-ChE-Technik zur Bestimmung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von E 600 mit der Methode nach GELDMACHER-V.-MALLINK-KRODT et al. (1969)	34
a) Meßapparatur	34
b) Inkubation mit E 600 (Paraoxon)	34
c) Messung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von E 600	35
7. Spektrophotometrische Messung der Paraoxonase-Aktivität nach KRISCH (1968)	35
8. Reaktionsablauf bei der Bestimmung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität mit der Methode von FRIEDBERG und SAKAI	38
9. Reaktionsablauf bei der Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität (ChE-RA) nach Zusatz von E 600 mit der Methode von GELDMACHER -V.MALLINCKRODT et al. (1969)	39
10. Reaktionsmöglichkeiten von DFP bei der Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität mit der modifizierten Methode von GREINER (1980)	41

	Seite
11. Berechnung der in den Arb.-Gr. 1 - 5 verwendeten DFP-Konzentrationen bei der Be- stimmung der Cholinesterase-Restaktivität	44
 C. Datenerhebung und statistische Auswertung	 46
1. Erhebung und Aufbereitung der Daten	46
2. Fehlersuche und Plausibilitätsprüfung	50
3. Datenvorbereitung	50
a) Erfassung der Doppelmessungen	50
b) Festlegung der Variablen	51
4. Statistische Auswertung	53
a) Einfache Datenbeschreibung: STATYS- Programm PO20	53
b) Histogramme: STATYS-Programm PO22	54
c) Korrelationsdiagramme: IMSD-Programm PLOT	55
d) Korrelationskoeffizienten: STATYS- Programm PO30	55
 D. Ergebnisse	 56
1. Cholinesterase-Ausgangsaktivität	56
a) Gruppenunterschiede der Cholinesterase- Ausgangsaktivität	56
b) Geschlechtsunterschiede der Cholinester-	61

	Seite
ase-Ausgangsaktivität	
c) Unterschiede der Cholinesterase-Ausgangsaktivität, in Abhängigkeit von den Blutgruppen des ABO-Systems und dem Rh-Faktor	65
d) Altersabhängigkeit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität	67
e) Altersabhängigkeit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität, getrennt nach dem Geschlecht	69
2. Cholinesterase-Restaktivität (DFP-RA)	71
nach Zusatz von DFP	
a) Gruppenunterschiede der Cholinesterase-Restaktivität	71
b) Geschlechtsunterschiede der Cholinesterase-Restaktivität	73
c) Unterschiede der Cholinesterase-Restaktivität, in Abhängigkeit von den Blutgruppen des ABO-Systems und dem Rh-Faktor	75
3. Korrelationen der Cholinesterase-Restaktivität nach DFP-Zusatz zum Serum	77
a) Korrelation der Cholinesterase-Restaktivität mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität	77
b) Korrelation der Cholinesterase-Aktivitäts-	83

	Seite
senkung (ChE-AS) mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität	83
4. Korrelationen der Cholinesterase-Restaktivität nach E 600-Zusatz zum Serum	95
a) Direkter Korrelationsvergleich der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP und nach Zusatz von E 600 mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität	95
b) Indirekter Korrelationsvergleich der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP und nach Zusatz von E 600 mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität	100
5. Korrelation der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP mit der Paraoxonase-Aktivität, gemessen nach KRISCH (1968)	102
E. Diskussion und Zusammenfassung	104

Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen

AA	=	Ausgangsaktivität ($\frac{\mu\text{l CO}_2}{30 \text{ Min.}}$)
Abb.	=	Abbildung
ACh	=	Acetylcholin
AChE	=	Acetylcholinesterase
c	=	Konzentration
ChE-AA	=	Cholinesterase-Ausgangsaktivität ($\frac{\mu\text{l CO}_2}{30 \text{ Min.}}$)
ChE-AS	=	Cholinesterase-Aktivitätssenkung ($\frac{\mu\text{l CO}_2}{30 \text{ Min.}}$)
ChE-RA	=	Cholinesterase-Restaktivität ($\frac{\mu\text{l CO}_2}{30 \text{ Min.}}$)
ChE-RA (%)	=	Cholinesterase-Restaktivität in Prozent der ChE-AA
DFP	=	Diisopropylfluorphosphat
DFP-ase	=	Diisopropylfluorphosphatase
DIP	=	Diisopropylphosphat
E 600	=	Diäthyl-p-nitrophenol-phosphat (Paraoxon)
E 605	=	Diäthyl-p-nitrophenol-thiophosphat (Para- thion)
HF	=	Fluorwasserstoff

IMSD = Institut für Medizinische Statistik und
Dokumentation

KK = Korrelationskoeffizient

MW = Mittelwert

Rh-Faktor = Rhesus-Faktor

A. EINLEITUNG

I. Diisopropylfluorphosphat

1. Entdeckung, Verwendung und Giftwirkung

LANGE und VON KRÜGER entdeckten 1932 die toxischen Eigenschaften von Alkylestern der Fluorphosphorsäure. Weitere Untersuchungen führten zu der Entdeckung verschiedener Phosphorverbindungen, deren bekannteste Vertreter E 605, E 600, Tabun und Soman wurden.

Diese Organo-Phosphatverbindungen besitzen nach MOUNTER (1963) folgende allgemeine Strukturformel:



R_1 = Alkylgruppe oder
Alkoxygruppe

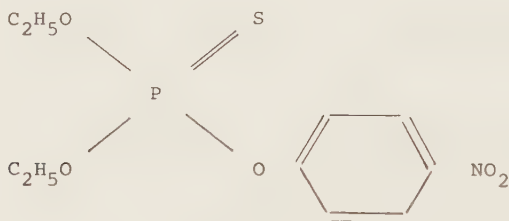
R_2 = Alkylgruppe oder
Alkoxygruppe oder
Diäthylaminogruppe

X = O oder
S

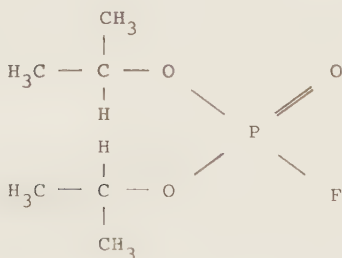
Y = F oder
CN oder
Arylgruppe oder
Pyrophosphatgruppe

Der Ersatz von R_1 durch eine Alkyl- oder Alkoxygruppe, von R_2 durch eine Alkyl- oder Alkoxy- oder eine Diäthylaminogruppe, von X durch O oder S und von Y durch F, CN, eine Aryl- oder Pyrophosphatgruppe in dieser allgemeinen

Strukturformel führt zu den verschiedenen Organophosphatverbindungen, deren bekannteste E 605 (Parathion) wurde: O,O Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)thiophosphat



Wird in der allgemeinen Strukturformel R_1 und R_2 durch eine Isopropylgruppe und X durch F ersetzt, so führt dies zu Diisopropylfluorophosphat (DFP), einem Organophosphat, das 1941 durch MC COMBIE und SOUNDERS synthetisiert wurde (MC COMBIE und SOUNDERS, 1946).



Diisopropylfluorophosphat (DFP)

Die Bedeutung dieser Organophosphate lag zuerst bei ihrer

Verwendung als Schädlingsbekämpfungsmittel auf Grund ihrer insektiziden Eigenschaften, die 1937 von SCHRADER und Mitarbeiter bei der Fa. BAYER entdeckt wurden. Mit Ausbruch des 2. Weltkrieges trat die Bedeutung dieser Verbindungen als Insektizide in den Hintergrund und die Forschung verlagerte sich auf Grund der hohen Toxizität dieser Organophosphatverbindungen auf die Entwicklung von Kampfstoffen.

Diese hohe Toxizität beruht, wie MACKWORTH 1942 beim DFP entdeckte, auf der Hemmung und Blockierung des Enzyms Cholinesterase im menschlichen Organismus, das Acetylcholin hydrolysiert und inaktiviert.

Acetylcholin hat im Nervensystem die allgemeine Funktion eines Überträgerstoffes. Bei der Übertragung nervöser Impulse wird Acetylcholin freigesetzt, das den Reiz an den Nervenendigungen (den sogenannten Synapsen) des parasympathischen (cholinergischen) Nervensystems und an den neuromuskulären Synapsen überträgt.

Der physiologische Erregungsvorgang einer Skelettmuskelzelle wird eingeleitet durch die Freisetzung von Acetylcholin im Bereich der neuromuskulären Synapse. Dies ist die Verknüpfungsstelle zwischen motorischer Nervenfasern und Skelettmuskelzelle. Das freigesetzte Acetylcholin löst die Änderungen der Membraneigenschaften des Sarko-

lemms aus, die schließlich zur Kontraktion führen. Innerhalb von Millisekunden wird dann jedoch dieses Acetylcholin durch die in großer Menge in der Endplatte lokalisierte Acetylcholinesterase hydrolysiert und biologisch inaktiviert, wodurch wieder der Ausgangszustand vor der Erregung einer Muskelzelle hergestellt wird.

Die Kenntnisse über den Mechanismus der Acetylcholin-Esterase-Reaktion sind besonders durch das Auffinden von Hemmstoffen der Cholin-Esterase und deren Gegenmittel gefördert worden. Bei den Hemmstoffen unterscheidet man zwischen reversiblen und irreversiblen. Zu den reversiblen Inhibitoren zählen die Alkaloide Physostigmin und Neostigmin, die durch Acetylcholin-Abbauhemmung einen prolongierten, jedoch reversiblen Acetylcholineffekt auslösen. Eine irreversible Hemmung bewirken E 605 und Diisopropylfluorophosphat (DFP). Bei Vergiftung mit diesen Substanzen ist auch die Aktivität der Pseudocholin-Esterase des Blutes herabgesetzt. Diese irreversible Hemmung der Cholinesterase führt zum schnellen Anstieg der Acetylcholinkonzentration im Blut und im Gewebe und damit zur Dauerdepolarisation der lebenswichtigen Erregungsleitungen des parasympathischen und neuromuskulären Nervensystems. Dies kann schließlich zum Tod des so vergifteten Organismus durch Lähmung der Atemmuskulatur oder Herzstillstand führen.

Nach Beendigung des 2. Weltkrieges und der internationalen Ächtung der chemischen Kampfstoffe veränderten sich erneut die Forschungsziele. Nicht mehr der Einsatz von DFP als Kampfstoff, sondern die Verwendung von DFP als Medikament wurde Ziel der weiteren Entwicklungsarbeiten. Die Verwendung von DFP als wirksamer Cholinesterasehemmstoff wurde bei Patienten mit Myasthenia gravis untersucht. Von den Augenärzten wurde DFP als Therapeutikum bei Patienten mit Glaukom und als diagnostisches Hilfsmittel bei Patienten mit Strabismus verwendet. Vor dem Einsatz von DFP in der Medizin wurden Untersuchungen über die pharmakologischen, lokalen und systemischen Wirkungen durchgeführt. Darüber hinaus war es für die Zulassung als Medikament notwendig, den DFP-Stoffwechsel beim menschlichen Organismus mit Aufnahme, Verteilung, Abbau und Ausscheidung von DFP zu kennen. Auf Grund der hohen Toxizität ist die Verwendung von DFP als Medikament immer mit der Gefahr einer versehentlichen Intoxikation verbunden. Deswegen wurden auch viele Untersuchungen zur Therapie von DFP-Vergiftungen durchgeführt.

Weitere Verwendungsgebiete für DFP ergaben sich in der Biochemie durch die Erkenntnis, daß DFP mit bestimmten Proteinen eine irreversible Bindung eingeht. Mit radioaktiv markiertem DFP³² konnten die aktiven Zentren von

DFP-empfindlichen Enzymen einer Strukturanalyse unterzogen werden.

Außerdem war es durch die irreversible DFP-Protein-Bindung möglich, auch ganze Zellen wie zum Beispiel die roten und weißen Blutkörperchen, mit DFP³² radioaktiv zu kennzeichnen, um dadurch den Blutkörperchen-Stoffwechseln erforschen zu können ^{+) .}

2. Reaktionsmöglichkeiten des DFP im menschlichen Organismus

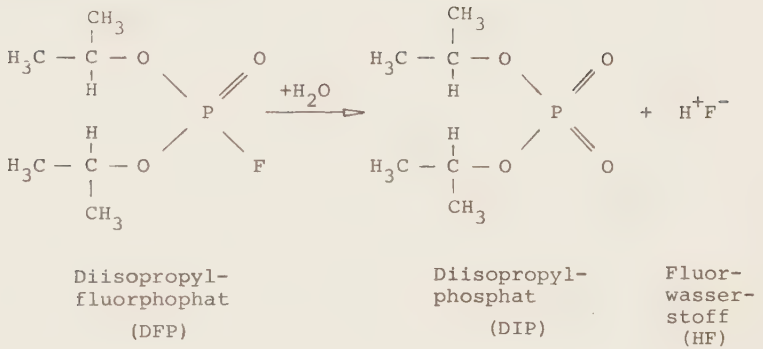
Für DFP bestehen im menschlichen Organismus die folgenden drei Reaktionsmöglichkeiten:

- a) spontane Hydrolyse
- b) enzymatische Hydrolyse
- c) Bindung an Proteine.

^{+) =} Veröffentlichungen von

- R.D. BARR et al. (1975)
- J.A. COHEN et al. (1954)
- P.F. HJORT et al. (1960)
- P. NOWOTNY et al. (1970)

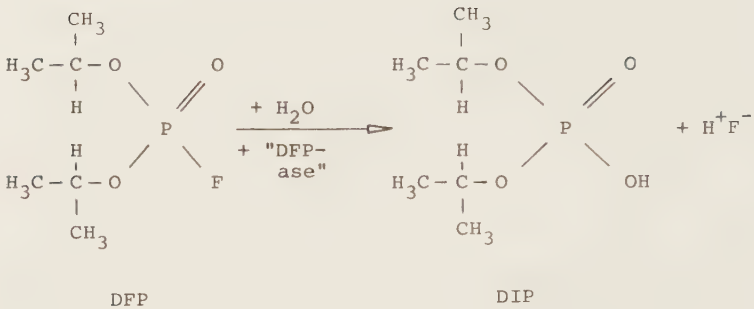
a) Spontane Hydrolyse:



Die spontane Hydrolyse von DFP spielt im lebenden Organismus nur eine geringe Rolle. Nach LATKI et al. (1961) lässt sich in lebenden Organismen schon nach nur 1 Stunde kein "freies" DFP mehr nachweisen. Dies ist auf die große Affinität des DFP zu vor allem proteolytischen Fermenten und auf die schnelle enzymatische Spaltung von noch vorhandenem, restlichem "freiem" DFP durch sogenannte "DFP-ase" zurückzuführen.

Da die Halbwertszeit für die hydrolytische Spaltung mit 16 Stunden relativ groß ist, wird die spontane Hydrolyse von DFP in wässrigen Lösungen bei Untersuchungen meistens vernachlässigt.

b) Enzymatische Hydrolyse:

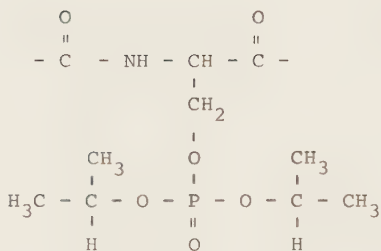


Die enzymatische Hydrolyse von DFP unterscheidet sich nicht prinzipiell von der DFP-Bindungsreaktion an ein Protein. Der Unterschied besteht darin, daß bei der enzymatischen Hydrolyse die Bindungsfestigkeit von DFP an eine "DFP-ase" geringer und reversibel ist, und die "DFP-ase" nach der Hydrolyse von DFP wieder unverändert im Ausgangszustand wie vor der Reaktion vorliegt. Bei der Reaktion von DFP mit Proteinen ohne "DFP-ase"-Eigenschaften ist die Bindung nach einer reversiblen Übergangsphase jedoch irreversibel.

die Grundlage sowohl der therapeutischen als auch der toxischen DFP-Wirkung sind. Bei diesen Reaktionen handelt es sich um stöchiometrische Umsetzungen, bei denen jeweils ein Molekül DFP mit einem Aminosäurerest aus dem aktiven Zentrum des Enzyms reagiert.

3. Irreversible Enzymblockade durch DFP

Bei der zu einer irreversiblen Enzymblockade führenden Bindung von DFP an ein Enzym ist ein Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms der Reaktionspartner von DFP. Dies ist das übereinstimmende Ergebnis der Arbeiten von OOSTERBAAN et al. (1958), JANSZ et al. (1959), WÄHLBY (1968) und WÄHLBY et al. (1966, 1968). Von diesen Autoren wurden verschiedene Esterasen, wie Pferdecholinesterase, Cholinesterase vom Rind und vom Zitteraal, Serum-Pseudocholinesterase, Pronase von *Streptomyces griseus*, Chymotrypsin, nicht jedoch menschliche Cholinesterase, nach Hemmung mit radioaktiv markiertem DFP^{32} einer genauen Strukturanalyse unterzogen. Bei dieser Analyse wurden die durch hydrolytische Enzymspaltung erhaltenen Peptide chromatographisch getrennt. Bei der Untersuchung der durch P^{32} -gekennzeichneten Peptide wurde festgestellt, daß P^{32} als Bestandteil des Diisopropylphosphatrestes nur an Serin gebunden vorhanden war.



Struktur der DFP-Serin-Bindung im Diisopropylphosphat-Enzym-Komplex

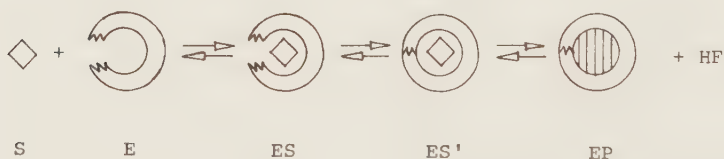
Die vorher genannten Autoren vertreten übereinstimmend die Ansicht, daß am Ende der Hemmreaktion Diisopropylphosphat (DIP) gebunden an einen nicht N-terminalen Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms vorliegt. Umstritten sind allerdings die Reaktionen, die vorher und damit zu einem Zeitpunkt ablaufen, an dem die DIP-Bindung an das Enzym noch reversibel ist. Diese Reaktionsvorgänge, die von einer sehr lockeren und reversiblen zu einer sehr festen und irreversiblen DFP-Enzymbindung führen, werden als "Alterungsprozeß" bezeichnet. Zum Ablauf des "Alterungsprozesses" gibt es im wesentlichen 3 Theorien.

- a) Theorie Nr. 1: Alterungsprozeß als Veränderung
der räumlichen Enzymstruktur
(MOON et al. (1965))

Die Reaktionen von DFP mit Chymotrypsin in ihrem zeit-

lichen Ablauf wurden von MOON et al. (1965) mit Messungen der Differenzspektrometrie und der optischen Rotation untersucht. Sie stellten dabei während der Reaktion eine Rotationsabnahme und differenzspektrometrische Veränderungen bei 290 nm fest. Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse stellen sie die Hypothese auf, daß bei der Reaktion kinetisch ein Zwischenprodukt durch eine vom Substrat verursachte Änderung der Enzymstruktur entsteht. Während dieses Zeitraumes bis zum Abschluß der Phosphorylierung sei die Bindung des DFP an den Serinrest reversibel.

Erläutert wird diese Theorie durch MOONs Modell:



E = Enzym (Chymotrypsin)

S = Substrat (DFP)

ES = DFP-Chymotrypsinkomplex

ES' = DFP-Chymotrypsin-Zwischenprodukt, gekennzeichnet durch Veränderungen der Differenzspektrometrie und der optischen Rotation

EP = phosphoryliertes Enzym (DIP-Chymotrypsin)

- b) Theorie Nr. 2: Alterungsprozeß als Ergebnis der Wanderung des DIP vom primären Reaktionspartner zu einem nicht N-terminalen Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms
- (WOOTON et al. (1960), NEURATH (1965),
MOUNTER et al. (1957))

Eine andere Erklärung des Alterungsprozesses gaben WOOTON et al. (1960). Sie bestätigten bei ihren Untersuchungen zwar die Ergebnisse von MOON et al. (1965), stellten dabei aber fest, daß diese Untersuchungsergebnisse unabhängig vom pH-Wert in einem Bereich von 1 - 11 waren und auch nach Denaturierung mit 8-molarer Harnsäure auftraten. Aus diesem Grund verwarfen sie MOON's Erklärung einer räumlichen Strukturveränderung. Nachdem auch die Absorptionsmaxima der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bei 290 nm liegen, nehmen sie primär eine Reaktion dieser Aminosäuren an, die zu einer covalenten Bindung zwischen DIP und einem Tryptophanrest führt.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen NEURATH (1965) und MOUNTER et al. (1957). Nach ihren Überlegungen ist aber der primäre Reaktionspartner für DFP neben Tyrosin und Tryptophan vor allem die Imidazolgruppe des Histidins. Als Beweis führen sie an, daß DFP-empfindliche Enzyme durch nicht-kompetitive Inhibitoren vor einer Hemmung und damit

einer Reaktion mit DFP bewahrt werden können, wenn deren Angriffspunkt der Imidazolring des Histidins ist. Außerdem wird durch Photooxidation des Imidazolringes sowohl die Reaktivität des Chymotrypsins als auch die Aktivität von "DFP-asen" gehemmt.

Die irreversible Enzymhemmung wird deshalb erklärt mit einer "Wanderung" des DIP vom Imidazolring des Histidins, dem primären Reaktionspartner, zu einem benachbarten Hydroxylradikal eines nicht N-terminalen Serinrestes. Damit ist der "ageing process" beendet, die DIP-Enzymbindung irreversibel.

Nach dieser Theorie besitzen nur solche Enzyme "DFP-ase"-eigenschaft, die im aktiven Zentrum zwar ein DFP-reaktionsbereites Histidin besitzen, in dessen nächster Nachbarschaft aber keinen N-terminalen Serinrest. In diesem Falle wird die energiereiche DIP-Imidazolbindung schnell wieder gespalten, da die Voraussetzungen für den "ageing process" fehlen.

- c) Theorie Nr.3: Alterungsprozeß als Ergebnis der Abspaltung einer Isopropylgruppe vom DIP-Enzym-Komplex (BEHREND'S et al. (1959) und JANSZ et al. (1959))
-

Bei Untersuchungen der Pseudocholinesterase des Pferdes fanden JANSZ et al. (1959) nach Hemmung durch DFP als Endprodukt Monoisopropylphosphorylserin (MIP-Serin) vor. Weitere Untersuchungen von BEHREND'S et al. (1959) zeigten, daß anfangs auch bei diesem Enzym DIP^{32} an Serin gebunden vorlag. Im weiteren Reaktionsablauf kommt es jedoch zu einer Abspaltung einer Isopropylgruppe und es ist nur eine Frage der Zeit, bis alles DIP-Serin als MIP-Serin vorliegt.

Darüber hinaus stellten sie fest, daß gegenüber DIP-Serin wirksame Reaktivatoren gegenüber MIP-Serin wirkungslos sind. Nach dieser Theorie besteht deshalb der Alterungsprozeß, zumindest für die Pseudocholinesterase des Pferdes, in der Abspaltung eines Isopropylrestes vom Serin-gebundenen DIP.

4. Pharmakologische Eigenschaften des DFP

a) Hemmung der Cholinesterase (ChE) durch DFP

Als Grund für die hohe Toxizität von DFP hatte bereits 1942 MACKWORTH die Hemmung der Cholinesterase durch DFP entdeckt.

Diese Feststellung untersuchten MAZUR et al. (1946) durch die Hemmung von Cholinesterase mit DFP und der

Beobachtung von Vergiftungserscheinungen. Bei der Bestimmung der Cholinesterase in Seren, Erythrozyten und Gehirnen von Tieren (Kaninchen und Affen) wurden nach DFP-Intoxikation stark erniedrigte Werte bestimmt. Auch bei menschlichen Seren und Erythrozyten kam es nach DFP-Intoxikation zu einem starken Abfall der Cholinesteraseaktivität, obwohl bei den Versuchspersonen kaum klinische Symptome auftraten. Dieser Widerspruch wird dadurch erklärt, daß bei den Versuchen die ChE-Aktivität mit Acetylcholin (ACh) als Substrat gemessen wurde. Im Organismus wird zwar ACh fast ausschließlich durch die Acetylcholinesterase (AChE) gespalten, in vitro wird ACh aber auch durch Pseudocholinesterasen (PseudoChE) hydrolysiert, die eine wesentliche größere Affinität zu DFP besitzen als die AChE (HAWKINS et al. 1947). Darüber hinaus liegt der Anteil der PseudoChE bei 99 % der Cholinesterasen des Plasmas. Diese Affinität der PseudoChE zu DFP wird nach MYERS (1952) noch durch die der Aliesterasen übertroffen.

II. Diisopropylfluorophosphat-ase (DFP-ase)

1. Reaktionsweise der DFP-ase

In der gebräuchlichen Nomenklatur wird durch den Namen des Enzyms gleichzeitig das Substrat dieses Enzyms er-

sichtlich, z.B. bezeichnet der Enzymname "ATP-ase" als natürliches Substrat dieses Enzyms "ATP". Von dieser Nomenklatur abweichend, wird die Bezeichnung "DFP-ase" für eine ganze Reihe von Enzymen verwendet. Ihr gemeinsames Merkmal ist die Hydrolyse von Dialkylfluorophosphat-verbindungen, ein natürliches Substrat für diese Enzymgruppe ist nicht bekannt. In der Enzymnomenklatur wird die DFP-ase durch die Nummer 3.8.2.1 charakterisiert. Die systematische Bezeichnung heißt Di-Isopropyl-Phosphoro-Fluoridat Fluorohydrolase. Damit ist sie charakterisiert als Hydrolase mit dem Angriffspunkt an der Phosphor-Halogen-Bindung organischer Organophosphatverbindungen.

Bei der enzymatischen Hydrolyse von DFP und anderen Dialkylfluorophosphatverbindungen durch DFP-ase wird immer nur die Phosphor-Fluor-Bindung hydrolytisch gespalten. Die Alkylester-Phosphor-Bindung bleibt immer unangetastet. Mit gereinigter Schweinenieren-DFP-ase stellten MOUNTER et al. (1954 b) fest, daß bei der enzymatischen Hydrolyse von verschiedenen Dialkylfluorophosphatverbindungen (DFP, Dibutylfluorophosphat, Diäthylfluorophosphat) eine stöchiometrische Umsetzung erfolgt, d.h. daß pro Mol Substrat ein Mol Fluorwasserstoffsäure und ein Mol Dialkylphosphorsäure freigesetzt wird. Dies bestätigten die Autoren COHEN et al. 1954, HANSEN et al. 1968 a, 1968 b, JANSEN et al. 1950 und

und RAMACHANDRAN 1966 a, die gleichzeitig feststellten, daß als Stoffwechselprodukt von DFP nie Isopropylalkohol oder eine organische Phosphorverbindung gefunden wurden.

2. Enzymeigenschaften der DFP-ase

Der überwiegende Teil dieser Dialkylfluorophosphatverbindungen wird in lebenden Organismen fast nur durch die DFP-ase enzymatisch abgebaut. Daß es sich bei der DFP-ase um ein Enzym handelt, hat MAZUR (1946) an DFP-ase-aktiven Gewebsextrakten des Kaninchens festgestellt. Er fand bei diesen Untersuchungen von DFP-ase die folgenden und für ein Enzym charakteristischen Eigenschaften: Thermolabilität, fehlende Dialysierbarkeit und Empfindlichkeit gegenüber typischen Enzyminhibitoren, wie zum Beispiel Quecksilberionen. Damit war für MAZUR der Enzymcharakter der DFP-ase nachgewiesen.

3. Vorkommen der DFP-ase beim Menschen

Bei den Säugetieren bestehen nach MOUNTER et al. (1955 b) hinsichtlich der DFP-ase-Verteilung in den verschiedenen Geweben keine großen Differenzen. Den größten DFP-ase-

gehalt besitzt bei Mensch, Ratte, Katze, Meerschweinchen und Schwein die Leber. Die in ihr enthaltene DFP-asemenge ist manchmal größer als die gesamte Menge im übrigen Organismus. Weiter kommt das Enzym in geringen Mengen in Nieren und der Dünndarmmucosa vor. Darüber hinaus ist DFP-ase nachweisbar in fast allen Geweben, wie Nebenniere, Milz, Gehirn, Herz, Lunge, Muskeln, Gonaden, Knochenmark, Pancreas und Thymus.

4. DFP-ase im menschlichen Serum

Die DFP-ase als ein DFP-hydrolysierendes Enzym wurde von MAZUR (1946) entdeckt. Da dies die einzige Arbeit ist, in der das Vorkommen von DFP-ase im menschlichen Serum mit DFP als Substrat untersucht und bestätigt wurde, erscheint es zweckmäßig, den Versuch genauer zu beschreiben. MAZUR hatte im Versuch H^+ -Ionen und F^- -Ionen als Produkte einer DFP-Hydrolyse im Serum von Kaninchen und Menschen gefunden. Im einzelnen hatte er $3,5 \times 10^{-5}$ Mol DFP in 0,5 ml Plasma im WARBURG-Apparat mit 0,5 ml 0,025 molarer Bicarbonatlösung gemischt. Die entstehende CO_2 -Menge wurde als Zeichen der H^+ -Ionenproduktion angesehen und gemessen. Um die spontane Hydrolyse des DFP in wässriger Lösung zu berücksichtigen, wurde von der gemessenen CO_2 -Menge der Wert subtrahiert,

der in einem Kontrollversuch mit $3,5 \times 10^{-5}$ Mol DFP in Wasser und Bicarbonatpuffer und ohne Serum bestimmt worden war. Das Endergebnis zeigte, daß menschliches Serum DFP-ase enthält. Sie beträgt allerdings nur 10 % der für Kaninchenserum bestimmten Konzentration.

Diese Versuche zum Nachweis einer DFP-ase-Existenz im menschlichen Serum wurden von keinem der später folgenden Autoren nachvollzogen. Es wurde von ihnen das Vorhandensein nicht bezweifelt. Beweise für das Vorkommen der Serum-DFP-ase beim Menschen finden sich in ihren Arbeiten jedoch nicht. Sie lassen sich nur durch Zusammenfassung mehrer Arbeiten konstruieren.

ALDRIDGE (1953 a, 1953 b) hatte festgestellt, daß sich im Serum der meisten Spezies zwei verschiedene Esterasentypen befinden, die A-Esterasen und die B-Esterasen. Charakterisiert ist die A-Esterase durch ihre Resistenz gegenüber Diaethyl-p-nitrophenylphosphat (E 600) und ihre Fähigkeit, p-Nitrophenylacetat schneller als p-Nitrophenylbutyrat zu hydrolysieren. Durch B-Esterasen wird p-Nitrophenylbutyrat rascher hydrolysiert und E 600 stellt einen potenten Inhibitor dar. Außerdem wurde gefunden, daß durch DFP ähnlich wie durch E 600 A-Esterasen nicht gehemmt und B-Esterasen gehemmt werden.

In weiteren Untersuchungen versuchte nun ALDRIDGE (1953 b) die Identität des E 600 hydrolysierenden Enzyms durch Vergleich der Aktivitäten mit der der A-Esterase gegenüber p-Nitrophenylacetat zu klären. Er fand dabei nahezu identische Eigenschaften für A-Esterasen und E 600-Esterase, wodurch ihm die Identität beider Esterasen bewiesen schien.

Im Kaninchenserum entdeckte MOUNTER (1954) eine DFP-ase, die E 600 hydrolysierte. Zusätzlich zu DFP und E 600 wurden durch dieses Enzym p-Nitrophenylacetat und Tetraaethylpyrophosphat gespalten. Gleiche Eigenschaften hinsichtlich der Hitzeempfindlichkeit und der Blockierbarkeit der enzymatischen Hydrolyse bei allen vier Substraten und eine kompetitive Hemmung bei Substratgemischen deuteten darauf hin, daß nur ein einziges Enzym für die Hydrolyse der vier Substrate verantwortlich war. Er zog daraus den Schluß, daß es sich bei der DFP-ase im Kaninchenserum um eine A-Esterase handele.

Würde man nun diese am Kaninchenserum gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen, wäre auch in der von ALDRIDGE (1953 b) erbrachten Identifizierung einer E 600-Esterase als A-Esterase gleichzeitig ein Beweis für die Existenz einer DFP-ase mit den Eigen-

schaften einer A-Esterase zu sehen. Obwohl es sich bei der DFP-ase des Kaninchenserums eindeutig um eine A-Esterase handelt, darf daraus nicht der Schluß gezogen werden, alle DFP-asen seien auch A-Esterasen oder alle A-Esterasen seien auch DFP-asen. Es gibt auch DFP-asen, wie z.B. die Schweinenieren-DFP-ase, die nicht in der Lage ist, E 600 zu spalten. Und bei weitem nicht alle Enzyme, die wegen ihrer E 600-hydrolysierenden Eigenschaft als A-Esterasen klassifiziert werden, sind gleichzeitig auch DFP-asen (MOUNTER, 1963).

B. PROBLEMSTELLUNG, UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND VER-
 WENDETE MESSMETHODEN

1. Problemstellung

ALDRIDGE (1953 a, 1953 b) unterschied im Serum verschiedener Tierarten und des Menschen zwischen den A- und den B-Esterasen. Die A-Esterase ist gegenüber E 600 resistent, während die B-Esterase davon inaktiviert wird. In weiteren Untersuchungen bestätigte ALDRIDGE die Identität des E 600-hydrolysierenden Enzyms, der Paraoxonase, mit der bereits bekannten A-Esterase.

MOUNTER (1954) fand im Kaninchenserum eine DFP-ase mit der Fähigkeit zur Hydrolyse von Paraoxon. Weitere Versuche bestätigten, daß es sich um ein mit der A-Esterase identisches Enzym handelt. Eine Übertragbarkeit dieser am Kaninchenserum gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen ist nicht möglich. A-Esterasen, die sich bezüglich ihrer Aktivität gegenüber der Substrate p-Nitrophenylacetat, -propionat und -butyrat nicht von der A-Esterase im Kaninchenserum unterscheiden, finden sich auch im menschlichen Serum. Es wurde jedoch nicht experimentell untersucht, ob die im menschlichen Serum vorhandene A-Esterase auch die Fähigkeit zur DFP-Hydrolyse besitzt.

Es gibt auch DFP-asen, wie z.B. die der Schweineiere, die nicht in der Lage ist, Paraoxon zu spalten. Außerdem sind nach MOUNTER (1963) viele Enzyme, die wegen ihrer Paraoxon hydrolysierenden Eigenschaft als A-Ester-asen klassifiziert werden, nicht gleichzeitig DFP-asen. Deshalb ist eine Übertragung dieser am Kaninchenserum gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen nicht möglich. Die Frage nach dem Vorkommen einer DFP-ase im menschlichen Serum ist deshalb nicht eindeutig geklärt, da außer der Veröffentlichung von MAZUR (1946) keine weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden.

In der vorliegenden statistischen Untersuchung soll deshalb versucht werden, eine Antwort auf die Frage zu finden: Existiert wie bei dem Alkylphosphat Paraoxon das hydrolysierende Enzym Paraoxonase auch für die chemisch nah verwandte Substanz DFP ein hydrolysierendes Enzym, eine DFP-ase, im menschlichen Serum? Ausgangspunkt für die Lösung dieser Frage waren die Arbeiten von GELDMACHER-V.MALLINCKRODT et al. (1979), die durch in vitro Vergiftung menschlicher Seren mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8}$ Mol/l) eine Unterscheidung in 3 genetisch determinierte Gruppen mit unterschiedlicher Paraoxonase-Aktivität treffen konnten.

Weiter stellten sich in diesem Zusammenhang folgende Fragen:

- a) Besteht ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der im menschlichen Serum nachgewiesenen Paraoxonase und einer evtl. vorhandenen DFP-ase entsprechend der von MOUNTER (1954) im Kaninchenserum gefundenen Übereinstimmung beider Enzyme.

- b) Besteht eine Abhängigkeit der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP von der Cholinesterase-Ausgangsaktivität.

- c) Ist die Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP abhängig von
 - Alter
 - Geschlecht
 - Blutgruppen des ABO-Systems
oder des Dd-Systems.

Da die statistisch auszuwertenden Untersuchungsergebnisse von fünf verschiedenen Arbeitsgruppen erzielt wurden, mußten die Ergebnisse auch auf Gruppenunterschiede geprüft werden.

2. Untersuchungsmaterial

Die statistisch zu untersuchenden Daten wurden erhalten auf Grund der Serenuntersuchung von 424 Einzelpersonen.

Bei diesen Personen handelte es sich insbesondere um Blutspender der Blutbank Erlangen, weiter um die Untersucher, deren nicht blutsverwandte Angehörige, sowie Freunde und Kollegen. Die insgesamt 445 Seren wurden in folgender Weise experimentell untersucht (siehe auch Tab. 1):

- a) Bestimmung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität (ChE-AA):

mit der Methode von FRIEDBERG und SAKAI (1958).

- b) Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität (ChE-RA) nach Zusatz von DFP:

mit der modifizierten Anti-ChE-Technik nach GREINER (1980).

- c) Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität (ChE-RA) nach Zusatz von E 600:

mit der Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-V. MALLINCKRODT et al. (1969). Diese wurde parallel an 100 Seren durchgeführt.

- d) Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität:

mit der spektralphotometrischen Methode nach KRISCH. Diese erfolgte parallel an 79 Seren.

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Untersuchungs-
ergebnisse stammten aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg und wurden erstellt
von

Arb.-Gr. 1: H. GRIMM
G. GREINER
T. MAIER

Arb.-Gr. 2: B. BURGER
H. BÖCKLER
Ch.MÜLLER

Arb.-Gr. 3: A. BREU
E. HÄUSSLER
A. AHNERT

Arb.-Gr. 4: U. WOLF
R. LANG
S. DIPPEL

Arb.-Gr. 5: P.M. SWOBODA
K. SCHENKE
R. LIPKA

Die Dissertationen der einzelnen Mitglieder dieser Arbeits-
gruppen befinden sich zum Teil noch in Vorbereitung.

Tab. 1: Übersicht der in den Arbeitsgruppen 1 - 5 angewandten Meßmethoden zur Untersuchung der 445 menschlichen Blutseren

Arb. Gruppe	Anzahl der Seren	a) Cholinesterase-Ausgangsaktivität n. Methode FRIEDBERG/SAKAI	b) Cholinesterase-Restaktivität n. DFP-Zusatz (Anti-ChE-Technik)	c) Cholinesterase-Restaktivität n. E 600-Zusatz (Anti-ChE-Technik)	d) Para-oxonase Aktiv. nach KRISCH
Gr. 1	30	x) ⁴	x) ¹⁺⁴	x) ⁴	x
Gr. 2	70	x	x	x	-
Gr. 3	44	x	x	-	-
Gr. 4	151	x	x	-	-
Gr. 5	150) ³	x	x	-	x) ²
Gr. 1-5	445				

-) ¹ von 30 Seren nur 24 gemessen
-) ² von 150 Seren nur 49 gemessen
-) ³ von den 150 Seren wurden bereits 21 auch in Arb.Gr. 4 gemessen
-) ⁴ Meßergebnisse nicht verwertet, da die im Vergleich zu den übrigen Arbeitsgruppen erhaltenen erheblich nach unten abweichen.

3. Meßmethoden

Als mögliche und zunächst brauchbar erscheinende Methode zur Bestimmung der DFP-ase-Aktivität wurde die Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-V.MALLINCKRODT et al. (1969), in der von GREINER (1980) für DFP-ase modifizierten Form verwendet. Diese Anti-ChE-Technik hatte sich bereits bei der Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität bewährt.

Die enzymatische Aktivität der Paraoxonase im menschlichen Serum wurde bestimmt mit folgenden beiden Methoden:

- a) Mit der Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-V.MALLINCKRODT et al. (1969), wobei die Paraoxonase-Aktivität in der Warburg-Apparatur durch die Bestimmung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und nach Zusatz von E 600 durch die Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität für jedes Serum ermittelt wurde.
- b) Mit der spektrophotometrischen Methode nach KRISCH (1968), die die enzymatische Aktivität der Paraoxonase durch die Bestimmung des aus E 600 abgespaltenen p-Nitrophenols mißt.

Zwischen den mit der direkten spektrometrischen Methode

erzielten Ergebnissen, ausgedrückt in U/l Serum, und den mit der Anti-ChE-Technik gefundenen Serumcholinesterase-Restaktivitäten, ausgedrückt in Prozent der Cholinesterase-Ausgangsaktivität, wurde von GELDMACHER-V.MALLINCKRODT et al. (1972) für Paraoxon ein hochsignifikant von Null verschiedener Korrelationskoeffizient (KK) von $r = 0,82$ bestimmt. Damit wurde bestätigt, daß die Paraoxonase-Aktivität auch über unterschiedliche Restaktivitäten der Cholinesterase nach Vergiftung mit E 600 bestimmt werden kann. Eine spektrophotometrische Meßmethode zur Bestimmung der DFPase-Aktivität analog der Paraoxonase-Bestimmung nach KRISCH, d.h. Messung des aus DFP abgespaltenen F^- , konnte wegen der Schwierigkeit bei der F^- -Konzentrationsbestimmung in den vorliegenden niedrigen Konzentrationen nicht in Erwägung gezogen werden. Deshalb wurde die Anti-ChE-Technik angewandt, um Aussagen über DFPase im menschlichen Serum machen zu können.

4. Gewinnung des Serums

Mit einer Venüle wurde 10 ml Blut entnommen und etwa 30 Minuten nach Entnahme 15 Minuten lang bei 1600 U/min zentrifugiert, wobei das überstehende Serum nicht hämolysieren durfte. Das gewonnene Serum wurde sofort abgetrennt, die Messungen spätestens nach 2 Tagen durchgeführt.

5. Anti-ChE-Technik zur Bestimmung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP mit der Methode nach GREINER (1980)

a) Meßapparatur

Die Serumcholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität wurde in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, nach der manometrischen Methode von AMMON (1934), modifiziert nach FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt.

Die Bedingungen der Inkubation mit DFP wurden auf die nachfolgende Aktivitätsmessung abgestimmt.

b) Inkubation mit DFP

Zur Herstellung der Giftlösung 1 wurde mittels einer geeichten Mikropipette 1 μ l DFP auf 90 ml destilliertes Wasser gegeben und etwa 8 Minuten lang gut im Erlenmeyerkolben geschüttelt (= DFP-Ansatz 1).

5 μ l dieser Lösung wurden mit 40 ml Verdünnungslösung wiederum 8 Minuten lang gut vermischt (= DFP-Ansatz 2). Die Verdünnungslösung setzte sich aus 10 Teilen einer 0,9 %igen Natriumchloridlösung und drei Teilen einer 1,26 %igen Natriumhydrogenkarbonatlösung zusammen. Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml des DFP-Ansatzes 2 verdünnt.

Die Konzentration im Inkubationsansatz beträgt bei dieser DFP-Verdünnung $c = 7,21 \cdot 10^{-9}$ Mol/l.

Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes pipettiert, das im Hauptraum 1,5 ml einer 0,546 %igen wässrigen Lösung von Butyrylcholinjodid enthielt.

Die Warburggefäße wurden dann auf Manometer aufgesteckt und in ein Wasserbad von 37 ° C gebracht. Dabei wurden vor Beendigung der Inkubationszeit alle Manometer mit einem Gemisch aus 5 % CO₂ und 95 % N₂ 20 Minuten lang begast.

Die Gesamtinkubationszeit betrug 60 Minuten, der pH-Wert lag bei etwa 7,7 (SÜLLMANN, 1964).

c) Messung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität
und der Cholinesterase-Restaktivität nach Zu-
satz von DFP

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Serumverdünnung aus den Anhangsbirnen in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt. Der pH-Wert sank daraufhin auf 7,2 (SÜLLMANN, 1964). Bei noch geöffneten Manometerhähnen wurde drei Minuten lang mit einer Frequenz von 100/Min. geschüttelt und anschließend die Manometerhähne geschlossen. Nach 15 und 30 Minuten wurde der Manometerstand notiert. In Doppelmessungen wurde ohne DFP-Zusatz die ChE-AA und mit DFP-Zusatz die ChE-RA der Seren bestimmt. Zur Kontrolle wurden bei jedem Versuch zwei Leerwerte mitgeführt. Dabei enthielt die Anhangsbirne des Warburgkölbchens nur Verdünnungslösung, so daß die Eigenhydrolyse des Substrates erfaßt werden konnte.

In zwei Versuchsabläufen wurden drei Seren mit insgesamt vier Leerwerten, vier Ansätzen ohne DFP (Bestimmung der ChE-AA) und vier Ansätzen mit DFP (Bestimmung der ChE-RA) untersucht.

Die 30 Min.-Werte der Ansatz-Messung wurden jeweils mit den entsprechenden Manometerkonstanten (SÜLLMANN, 1964) multipliziert und das arithmetische Mittel errechnet. Ebenso wurden die beiden Leerwerte berechnet und der Mittelwert aus beiden vom obigen Wert subtrahiert.

Im zweiten Versuchsablauf wurde genauso verfahren und aus den Versuchsergebnissen erneut das arithmetische Mittel gebildet. Die Aktivität wird in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$ angegeben. Dieser Wert ist auf ein Serumvolumen von 0,15 ml bezogen.

6. Anti-ChE-Technik zur Bestimmung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von E 600 mit der Methode nach GELDMACHER-V.MALLINCKRODT et al. (1969)

a) Meßapparatur

Wie unter 5 a) "Meßapparatur" auf Seite 31 beschrieben.

b) Inkubation mit E 600 (Paraaxon)

Zur Herstellung der Giftlösung wurde mittels einer geeichten Mikropipette 1 μl E 600 auf 90 ml destilliertes Wasser gegeben und etwa 8 Minuten lang gut im Erlenmeyerkolben geschüttelt.

10 μl dieser Lösung wurden mit 13,5 ml Verdünnungslösung wiederum 8 Minuten lang gut vermischt.

Die Verdünnungslösung setzte sich aus 10 Teilen einer

0,9 %igen Natriumchloridlösung und drei Teilen einer 1,26 %igen Natriumhydrogenkarbonatlösung zusammen. Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der E 600-haltigen Verdünnungslösung verdünnt, sodaß die E 600-Konzentration im Inkubationsansatz $c = 3,2 \times 10^{-8}$ molar war.

Die weitere Durchführung der Inkubation erfolgte wie unter 5 b) "Inkubation mit DFP" auf Seite 32 beschrieben.

c) Messung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität
und der Cholinesterase-Restaktivität nach Zu-
satz von E 600

Diese erfolgte wie unter 5 c) "Messung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP" auf Seite 33 beschrieben.

7. Spektrophotometrische Messung der Paraoxonase-Ak-
tivität nach KRISCH (1968)

Mit einem registrierenden Spektrophotometer (Mo-
dell 24 der Firma Beckmann Instruments) wurde bei
der Wellenlänge 405 nm die Extinktion der durch enzyna-

tische Hydrolyse bei pH 11,2 und 25° C freigesetzten Menge an p-Nitrophenol gemessen.

Die verwendeten Lösungen entsprachen praktisch der Vorschrift des Standardtests von KRISCH (1968):

0,1 M Glycin-Natronlauge-Puffer pH 11,2.

E 600 Stammlösung: $1,2 \times 10^{-2}$ M E 600 in 0,1 M Tris-puffer pH 9,0. Die Stammlösung wurde zum Gebrauch 1 : 5 mit dest. Wasser verdünnt.

Serum, 1 : 5 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt.

Die große Wirkungsbreite des 0,1 M Glycin-NaOH-Puffers, ermöglichte die Ausschaltung eines pufferbedingten Störfaktors.

Es erwies sich im Meßverfahren als sehr vorteilhaft, das Puffergemisch von der umgebenden Luft (insbesondere der Atemluft beim Pipettieren) möglichst fernzuhalten, um ein Absinken des pH-Wertes im Verlauf der Messung zu vermeiden.

Der Meßansatz war wie folgt zusammengesetzt:

In ein Reagenzglas wurden pipettiert:

1,65 ml Puffer (pH 11,2)

+ 0,50 ml E 600-Lösung

+ 0,25 ml 1 : 5 verdünntes Serum

Sofort nach Zugabe des Serums wurde die Lösung in eine Küvette gefüllt.

In Abständen von jeweils 30 sec. und über einen Zeitraum von 150 sec. wurde die Extinktion registriert. Zur Auswertung jedoch kam nur die Extinktionsdifferenz von 150 minus 30 sec., abzüglich der Extinktionsdifferenz des Leerwertes (E 600-Hydrolyse im gleichen Milieu ohne Serum), über zwei Minuten (ΔE).

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in Mol abgespaltenes p-Nitrophenol wurde der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin-NaOH-Puffer, pH 11,2)

$$E_{405 \text{ nm}} = 18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{Mol}^{-1}$$

zugrundegelegt.

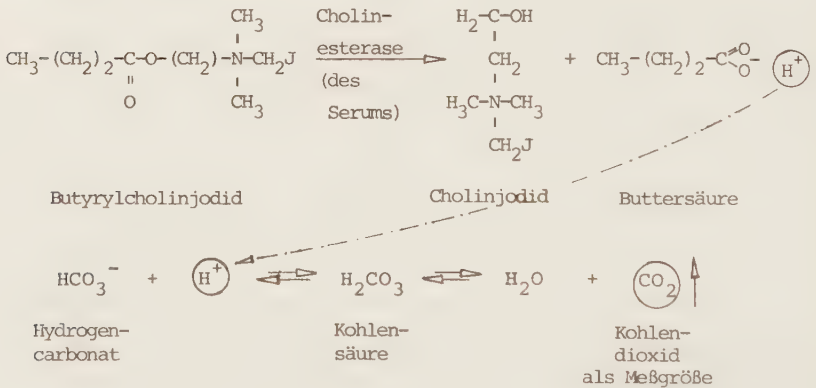
10 μMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten danach (bei $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$) eine Extinktion von 0,1805. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf ml Serum durch Multiplikation mit 20), der Meßzeit (Umrechnung auf eine Min. durch Division durch 2) und des Ansatzvolumens (2,4 ml; Multiplikation mit 2,4) errechnet sich die Aktivität (in $\mu\text{Mol} \times \text{Min}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ Serum) nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \times 10 \times 2,4 \times 20}{0,1805 \times 2} = E \times 1330 \text{ (U/l Serum)}$$

8. Reaktionsablauf bei der Bestimmung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität mit der Methode von FRIEDBERG und SAKAI

Die Bestimmung der ChE-AA läuft nach dem aus der folgenden Abbildung 1 ersichtlichen Schema ab.

Abb. 1: Reaktionsablauf bei der Bestimmung der ChE-AA



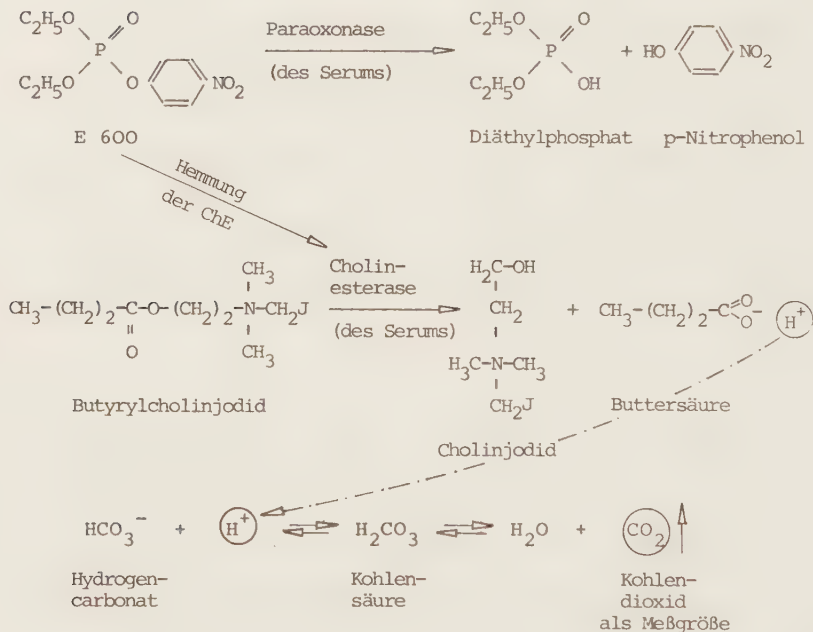
Im Untersuchungskolben befindet sich als Substrat Butyrylcholinjodid, das nach Zusatz des Serums durch das im Serum enthaltene Enzym Cholinesterase enzymatisch zu Cholin und Buttersäure umgesetzt wird. Die entstehende Buttersäure wirkt nun als gegenüber Kohlensäure stärkere Säure auf das gleichzeitig im Reaktionskolben vorhandene, gesättigte Hydrogencarbonat/Kohlensäure-System in der Weise, daß aus diesem sich im Reaktionsgleichgewicht befindlichen

System durch Verschiebung des Gleichgewichtes auf die Seite der Kohlensäure diese freigesetzt wird. Die freiwerdende Kohlensäure verschiebt nun ihrerseits das vorhandene Kohlensäure/Kohlendioxid-Gleichgewicht auf die Seite des Kohlendioxids, das als Gas aus der Lösung entweicht. Die Menge des freiwerdenden Kohlendioxids wird manometrisch ermittelt und dient als Meßgröße für den Substratumsatz/Zeiteinheit. Der Substratumsatz ist wiederum direkt von der Enzymaktivität der Cholinesterase abhängig, so daß die gemessene Kohlendioxidmenge eine Aussage über die Cholinesteraseaktivität im Serum ergibt.

9. Reaktionsablauf bei der Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität (ChE-RA) nach Zusatz von E 600 mit der Methode von GELDMACHER-V.MALLINCKRODT et al. (1969)
-

Bei der Bestimmung der ChE-RA nach Zusatz von E 600 stellt man sich den aus der folgenden Abbildung 2 ersichtlichen Reaktionsablauf vor.

Abb. 2: Reaktionsablauf bei der Bestimmung der ChE-RA nach Zusatz von E 600 mit der Methode von GELDMACHER-V.MALLINCKRODT et al. (1969)



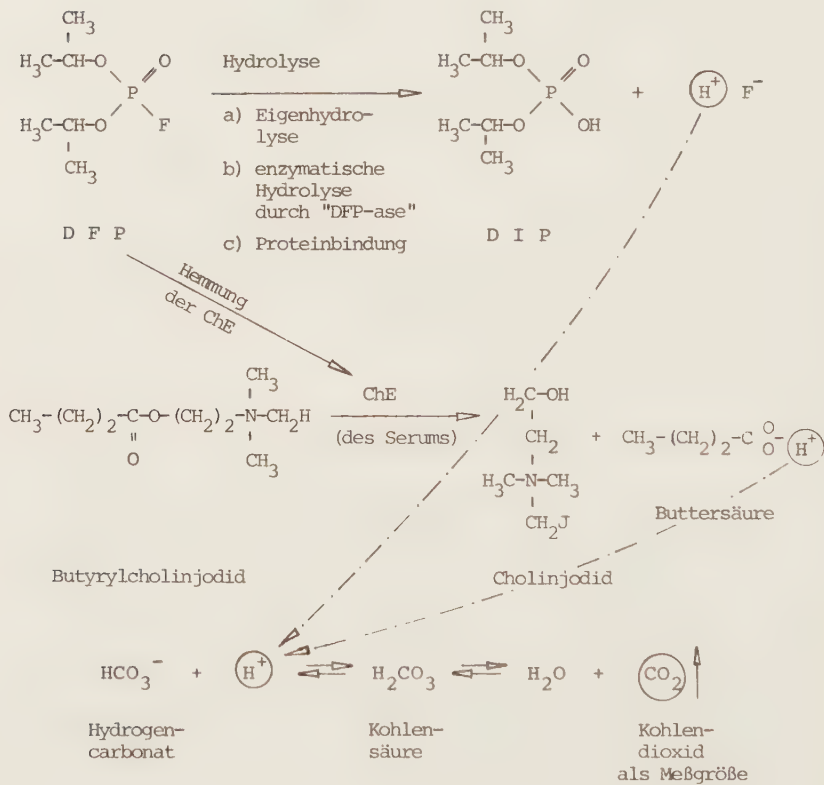
Gegenüber der in Abbildung 1 dargestellten Reaktionen bei der Bestimmung der ChE-AA wird vor Beginn der Reaktion das Serum mit E 600 inkubiert. E 600 führt zu einer Hemmung der Serum-ChE, die zu einem geringeren Umsatz von Butyrylcholinjodid und damit im Endeffekt zu einer niedrigeren Kohlendioxidentwicklung (= Meßwert) führt. Eingeschränkt wird

die ChE-Hemmung durch E 600 von der hydrolytischen Spaltung, die E 600 durch das im Serum vorhandene und sehr aktive Enzym Paraoxonase erfährt. Je mehr Paraoxonase im Serum vorhanden bzw. je aktiver dieses Enzym ist, desto mehr E 600 wird rasch hydrolytisch gespalten. Dadurch kann weniger ChE durch E 600 blockiert werden, was zu einer stärkeren Kohlendioxidfreisetzung führt. Nachdem die zu den Serumproben zugesetzte E 600-Menge immer konstant ist, weist eine niedrigere Kohlendioxidentwicklung auf eine niedrigere Serum-Paraoxonaseaktivität und eine höhere Kohlendioxidfreisetzung auf eine höhere Paraoxonaseaktivität hin.

10. Reaktionsmöglichkeiten von DFP bei der Bestimmung
der Cholinesterase-Restaktivität mit der modifizier-
ten Methode von GREINER (1980)

Bei der Bestimmung der ChE-PA nach Zusatz von DFP zum Serum bestehen folgende, in der Abbildung 3 dargestellten Reaktionsmöglichkeiten des DFP's.

Abb. 3: Reaktionsmöglichkeiten von DFP bei der Bestimmung der ChE-RA nach Inkubation von Serum mit DFP



Bei der ChE-RA-Bestimmung nach Inkubation mit DFP bestehen die gleichen Reaktionsmöglichkeiten wie bei der ChE-RA-Bestim-

mung nach Zusatz von E 600 zum Serum (siehe Seite 39-41).

Auch DFP hemmt analog dem E 600 die ChE.

Außerdem bestehen für DFP noch folgende Hydrolysemöglichkeiten:

- a) Eigenhydrolyse: ist zu vernachlässigen (siehe Seite 7).
- b) enzymatische Hydrolyse, z.B. durch "DFP-ase". Dabei würde H^+ freigesetzt, was ein höheres CO_2 -Meßergebnis bewirken würde (siehe auch Seite 8).
- c) Hydrolyse über eine Bindung an ein Protein (siehe auch Seite 9): Nach Bildung eines DFP-Protein-Komplexes erfolgt eine H^+ -Abspaltung erst nach Komplexumlagerung, die bestimmte Zeit benötigt. Es ist deshalb nicht zu erwarten, daß in den für die Messung benötigten 30 Minuten eine Beeinflussung der CO_2 -Entwicklung und damit des Meßergebnisses eintritt.

Aus diesen Gründen sind bei einer Diskussion der ChE-RA-Bestimmung nach Zusatz von DFP vor allem folgende Reaktionsmöglichkeiten des DFP's zu berücksichtigen, die zu einer Beeinflussung des Meßergebnisses führen können:

- 1) Die enzymatische Hydrolyse von DFP durch "DFP-ase", die durch Freisetzung von H^+ zu einer CO_2 -Entwick-

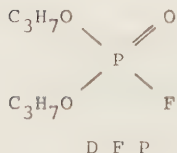
lung führen würde. Die Existenz einer "DFP-ase" im menschlichen Serum ist allerdings nicht sicher bewiesen.

2) Die Bindung von DFP an Proteine, die erst nach einer Umlagerungsreaktion zu einer Freisetzung von H^+ führt. Als Zeitreaktion bewirkt das keine wesentliche Meßergebniserhöhung.

3) Eine Hemmung der ChE durch von der DFP-ase nicht hydrolysiertes DFP und damit eine verminderte Freisetzung von Buttersäure aus Butyrylcholinjodid. Das bedeutet eine gegenüber dem Ausgangswert geringere CO_2 -Entwicklung im Meßansatz.

11. Berechnung der in den Arb.-Gr. 1 - 5 verwendeten DFP-Konzentrationen bei der Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivität ---

Die in den einzelnen Arbeitsgruppen bei der ChE-Bestimmung zur Anwendung gelangte, unterschiedlich große DFP-Konzentration (c_{DFP}) im Inkubationsansatz wird nach folgendem Schema errechnet.



Molekulargewicht: 184,15

Dichte: 1,0622 g / cm³ (SCHRADER)

$$1 \mu\text{l DFP} = 10^{-3} \text{ ml DFP} = 1,0622 \times 10^{-3} \text{ g DFP}$$

in 90 ml, davon $5 \times 10^{-3} \text{ ml} \longrightarrow$ in 40 ml, davon

$1,35 \text{ ml} + 0,15 \text{ ml Serum} \longrightarrow 1,5 \text{ ml Inkubations-}$

Ansatz.

$$\begin{aligned} c_{\text{Inkubations-Ansatz}} &= \frac{1,0622 \times 10^{-3} \text{ g}}{90 \text{ ml}} \times \frac{5 \times 10^{-3} \text{ ml}}{40 \text{ ml}} \times \frac{1,35 \text{ ml}}{184,15 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ Mol}}{1} \bigg/ 1,5 \text{ ml} \\ &= 0,0108 \times 10^{-9} \text{ Mol} / 1,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$c_{\text{Inkubations-Ansatz}} = 7,210 \times 10^{-9} \text{ Mol} / 1$$

In der folgenden Tabelle 2 sind die in den einzelnen Arbeitsgruppen verwendeten DFP-Konzentrationen zusammengestellt.

Tab. 2: DFP-Konzentrationen der Arb.-Gr.1 - 5

	DFP - Ansatz 1	c_{DFP} im Inkubations-Ansatz
Arb.-Gr. 1	1 μl DFP in 90 ml Wasser, bidest.	$7,210 \times 10^{-9} \text{ Mol/l}$
Arb.-Gr. 2	1 μl " " 90 ml "	$7,210 \times 10^{-9} \text{ Mol/l}$
Arb.-Gr. 3	1 μl " " 120 ml "	$5,408 \times 10^{-9} \text{ Mol/l}$
Arb.-Gr. 4	1 μl " " 135 ml "	$4,807 \times 10^{-9} \text{ Mol/l}$
Arb.-Gr. 5	1 μl " " 110 ml "	$5,899 \times 10^{-9} \text{ Mol/l}$

C. DATENERHEBUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

1. Erhebung und Aufbereitung der Daten

Die Untersuchungen wurden im Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt. Die Probanden waren eine Zufallsauswahl von Blutspendern der Blutbank Erlangen, von Studenten, den Untersuchern und deren nicht blutsverwandten Angehörigen. Alle untersuchten Personen waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesund und litten wissentlich an keinen Erkrankungen, insbesondere nicht an Leberkrankheiten oder an Diabetes mellitus.

Bei den in 280 Fällen vorliegenden Angaben zur Blutgruppe handelte es sich ausschließlich um von der Blutbank Erlangen bestimmte Blutgruppen-Daten des ABO- und Rh-Systems. Nur diese Blutgruppen-Bezeichnungen wurden bei der Datenerhebung berücksichtigt. Um zufällige Blutsverwandtschaft zwischen zwei Probanden auszuschließen, wurden bei den Einzelpersonen, außer bei einem Elternpaar, keine Versuchspersonen mit gleichem Nachnamen für die Untersuchungen herangezogen. Somit wurde Blutsverwandtschaft der Versuchspersonen untereinander, soweit möglich, ausgeschaltet. Insgesamt lagen die aus der folgenden Tab. 3 ersichtliche Anzahl der Daten vor.

Tab. 3: Anzahl der vorliegenden Daten

(Gesamtzahl n = 424)

Geschlecht:	424 x	Alter:	424 x
ABO-Blutgruppe:	280 x	Rh-Faktor:	280 x
Ausgangsaktivität der Cholinesterase:			424 x
Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung mit DFP:			418 x
Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung mit E 600:			99 x
Paraoxonase-Bestimmung nach KRISCH:			79 x

Für die statistische Auswertung diente als Richtschnur das vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation herausgegebene Skriptum für deskriptive statistische Auswertungen. An Hand dessen wurde der auf der Abb. 4 wiedergegebene Erhebungsbogen erstellt, in den die Probanden mit ihren persönlichen Daten

- a) Name und Vorname
- b) Alter
- c) Geschlecht
- d) Blutgruppe des ABO-Systems mit Rh-Faktor

aufgenommen wurden.

Die Angaben zum Geschlecht, zur Blutgruppe des ABO-Systems und zum Rhesus-Faktor wurden entsprechend dem auf dem Bogen ersichtliche Zahlen-Code verschlüsselt und eingetragen. Die Bögen wurden fortlaufend von 1 - 445 nummeriert. Dazu wurde die Arbeitsgruppen-Nr. und Fall-Nr. in der jeweiligen Gruppe notiert.

Weiter wurden folgende Meßwerte eingetragen:

- e) ChE-Ausgangsaktivität ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min.}$)
- f) ChE-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP
($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$)
- g) ChE-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600
($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$)
- h) Paraoxonase-Aktivität nach KRISCH (U/l).

Bei der statistischen Auswertung mußten Beeinflussungen durch Doppelmessungen ausgeschaltet werden. Doppelmessungen waren Messungen von an verschiedenen Tagen abgenommenen Serumproben ein und derselben Person (z.B. bei 2 Blutspenden) durch verschiedene Gruppen. Deshalb wurden Mehrfachmessungen an einem Probanden im Erhebungsbogen vermerkt, mit ergänzender Angabe des Zeitpunktes, an dem die Untersuchungen durchgeführt wurden.

Die auf einem Erhebungsbogen zusammengefaßten Daten wurden auf Lochkarten übertragen. Für jeden Bogen wurde eine Lochkarte verwendet.

Abb. 4: Erhebungsbogen

NAME:..... VORNAME:..... ALTER (JAHRE):.....

ERHEBUNGSBOGEN-NR. 3

ARBEITSGRUPPEN-NR. (1-6) 4

FALL-NR. INNERHALB DER GRUPPE 7

GESCHLECHT (♂=1 ; ♀=2) ☒ 8

ALTER (JAHR DER MESSUNG - GEBURTSJAHR) 11

BLUTGRUPPE (ABO-SYSTEM)
 A = 1
 B = 2
 O = 3
 AB = 4 12

RH - FAKTOR (+) = 1 ; (-) = 2 13

ANTI-CHE-TECHNIK:

CHE-AUSGANGSAKTIVITÄT ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ MIN.}$) , 19

CHE-RESTAKTIVITÄT NACH DFP-ZUSATZ ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ MIN.}$)(1) , 24

CHE-RESTAKTIVITÄT NACH E 600-ZUSATZ ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ MIN.}$)(2) , 29

KRISCH-METHODE:

PARADOXANASE-AKTIVITÄT (U/l) , 35

WIEVIELTE MESSUNG VON (1) AN DIESEM PROBANDEN ☒ 36

WIEVIELTE MESSUNG VON (2) AN DIESEM PROBANDEN ☐ 37

WURDE AN D. PROB. ZUGLEICH (1) U. (2) BESTIMMT NEIN = 1 ; JA = 2 ☐ 38

NUR FALLS AN DIESEM PROBANDEN MEHRFACH MESSUNGEN GEMACHT WURDEN:

MESSDATUM VON (1) 46

MESSDATUM VON (2) 52

2. Fehlersuche und Plausibilitätsprüfung

Zur Überprüfung abgelochter Daten auf Fehler erfolgte ein Datenausdruck mit spaltenweiser Auszählung. Zunächst wurden alle Angaben auf den Lochkarten ausgedruckt. Darauf wurde der Inhalt der einzelnen Lochspalten ausgezählt und in Tabellenform wiedergegeben. Die spaltenweise Auszählung wurde dann zur Fehlersuche darauf verwendet, ob nur vorgesehene Verschlüsselungen vorkamen. In Spalte 9, für das Geschlecht darf z.B. immer nur eine 1 (für männlich) oder eine 2 (für weiblich) vorhanden sein. Jede andere vorkommende Zahl würde auf eine falsche Codierung hinweisen.

3. Datenvorbereitung

a) Erfassung der Doppelmessungen

Zur Erfassung der Doppelmessungen wurde ein alphabetischer Datenausdruck der auf den Lochkarten festgehaltenen Probandennamen vorgenommen. Durch die hintereinander folgende zweifache Namensnennung wurden 21 Doppel-

messungen festgestellt, bei denen Serumproben des gleichen Probanden in unterschiedlichen Arbeitsgruppen in gleicher Weise gemessen wurden.

Die Angabe der Doppelmessung wurde auf dem Erhebungsbogen nachgetragen und auf der Lochkarte nachgelocht. Die auf den Lochkarten festgehaltenen Daten wurden nun auf eine Speicherplatte (LFD) übertragen und dort gespeichert. Um Datenschutz zu gewährleisten, wurden die Namen der Versuchspersonen nicht mit auf die Speicherplatte übertragen.

b) Festlegung der Variablen

Die auf dem Erhebungsbogen unter den Spalten-Nummern 4 bis 39 ersichtlichen Angaben wurden für die Computerprogramme als Variable X_1 bis X_{12} festgelegt:

- | | | |
|---------|--|---|
| X_1 : | Arbeitsgruppen-Nr. | |
| X_2 : | Fall-Nr. (innerhalb der Gruppe) | |
| X_3 : | Geschlecht | |
| X_4 : | Alter | |
| X_5 : | Blutgruppe des ABO-Systems | |
| X_6 : | ChE-AA (μ l CO_2 /30 Min.) | } Bestimmung
mit der
Anti-ChE-
Technik |
| X_7 : | ChE-RA (μ l CO_2 /30 Min.) nach DFP-Zusatz | |
| X_8 : | ChE-RA (μ l CO_2 /30 Min.) nach E 600-Zusatz | |

- X_9 : Paraoxonase-Aktivität (U/l): Bestimmung mit der KRISCH-Methode
- X_{10} : ChE-RA-Doppelmessung nach DFP-Zusatz
- X_{11} : ChE-RA-Doppelmessung nach E 600-Zusatz
- X_{12} : ChE-RA-Bestimmung nach DFP- und nach E 600-Zusatz am gleichen Serum eines Probanden

Dazu wurden durch Transformation aus den gegebenen Variablen die folgenden 6 weiteren Variablen X_{13} - X_{18} erhalten:

X_{13} : ChE-Aktivitätssenkung ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$) :	$\left. \begin{array}{l} \text{Anti-ChE-} \\ \text{Technik:} \\ \text{ChE-RA} \\ \text{nach DFP-} \\ \text{Zusatz} \end{array} \right\}$
$\text{ChE-AS} = \text{ChE-AA} - \text{ChE-RA}$	
X_{14} : $\text{logit ChE-RA} = \ln \frac{\text{ChE-RA}}{\text{ChE-AA} - \text{ChE-RA}}$	
X_{15} : $\text{ChE-RA (\%)} = \frac{\text{ChE-RA}}{\text{ChE-AA}} \times 100$	
X_{16} : $\text{ChE-AS (\mu l CO}_2/30 \text{ Min.}) = \text{ChE-AA} - \text{ChE-RA}$	$\left. \begin{array}{l} \text{Anti-ChE-} \\ \text{Technik:} \\ \text{ChE-RA} \\ \text{n. E 600-} \\ \text{Zusatz} \end{array} \right\}$
X_{17} : $\text{logit ChE-RA} = \ln \frac{\text{ChE-RA}}{\text{ChE-AA} - \text{ChE-RA}}$	
X_{18} : $\text{ChE-RA (\%)} = \frac{\text{ChE-RA}}{\text{ChE-AA}} \times 100$	

Die für die Transformationen benötigten Programm-Lochkarten wurden entsprechend den Skriptangaben des Programmsystems STATSYS (N. VICTOR et al. 1973) über "Transformationskarten" erstellt.

Um aus allen vorliegenden Fällen nur bestimmte Fälle nach den gewünschten Kriterien herausziehen und zusammenfassen zu können, wurde meist das "Schaufelprogramm" (G. HOMMEL, D. KOCH, 1978) genannte spezielle Programm den Datenauswertungsprogrammen vorgeschaltet. Damit war es für die statistische Auswertung möglich, aus allen Fällen nur bestimmte Fälle für die Auswertung herauszuziehen, wie z.B. nur die Meßwerte aller Erstmessungen, oder nur die Daten der männlichen oder weiblichen Probanden oder nur die Angaben einer Arb.-Gruppe oder die Meßwerte von zwei oder drei Kriterien kombiniert.

4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde im Rechenzentrum der Universität Erlangen-Nürnberg auf der Rechenmaschine TR 440 unter Verwendung des Programmsystems STATSYS (VICTOR et al. 1973) und eigener Programme des IMSD durchgeführt. Dabei wurden die im folgenden näher beschriebenen Programme verwendet.

a) Einfache Datenbeschreibung: STATYS-Programm PO20

Mit dem STATSYS-Programm PO20 wurde von allen stetigen Variablen einschließlich der durch Transformation gewon-

nenen eine einfache Datenbeschreibung erstellt. Damit wurden von den vorhandenen Daten folgende Angaben erhalten:

- Zahl der eingehenden Fälle
- Mittelwert $\bar{x}$ (aus diesen Fällen)
- Standardabweichung s (aus diesen Fällen)
- Minimaler Wert (aus diesen Fällen)
- Maximaler Wert (aus diesen Fällen)
- 95 %- und 99 %-Konfidenzbereich des Mittelwertes, unter der Voraussetzung der Normalverteilung (die nicht geprüft wird).

b) Histogramme: STATSYS-Programm PO22

Mit diesem Programm wurden von allen gewünschten Variablen Summenhäufigkeitsverteilungen erhalten. Dazu wurde die horizontale Achse in 30 Klassen unterteilt. Die Klassengrenzen wurden durch Angabe von Anfangswert und Intervallbreite (äquidistante Einteilung) vorgegeben. Die vertikale Achse wurde nach maximaler Klassenbesetzung eingeteilt.

c) Korrelationsdiagramme: IMSD-Programm PLOT

Mit diesem Programm kann der Zusammenhang zweier Variablen durch ein Korrelationsdiagramm graphisch dargestellt werden. Dabei wird eine Variable auf der Abszisse, die andere auf der Ordinate abgetragen. Die Größe des Korrelationsdiagramms wird durch die Breiten- und Höhenangaben bestimmt und ist auf eine Druckseite beschränkt. Das Programm liest von jedem Fall ein Wertepaar (x, y) entsprechend der Reihenfolge auf der Eingabedatei. Fällt ein Fall in ein durch die Intervall-einteilung der Koordinatenachsen definiertes Feld, so wird an dieser Stelle ein Sternchen ausgegeben. Bei mehr als einem Fall erfolgt eine Zahlenangabe (2,3 ... 9 = 2,3 ... 9 Fälle).

d) Korrelationskoeffizienten: STATSYS-Programm PO30

Das STATSYS-Programm PO30 dient der Berechnung von Korrelationskoeffizienten. Dazu ist es bei Bedarf möglich, die Steigungen der Regressionsgeraden von y auf x mit der Bezeichnung Regressionskoeffizienten-Matrix 1 (schließen von x auf y), sowie von x auf y mit der Bezeichnung Regressionskoeffizienten-Matrix 2 (schließen von y auf x) ausrechnen zu lassen.

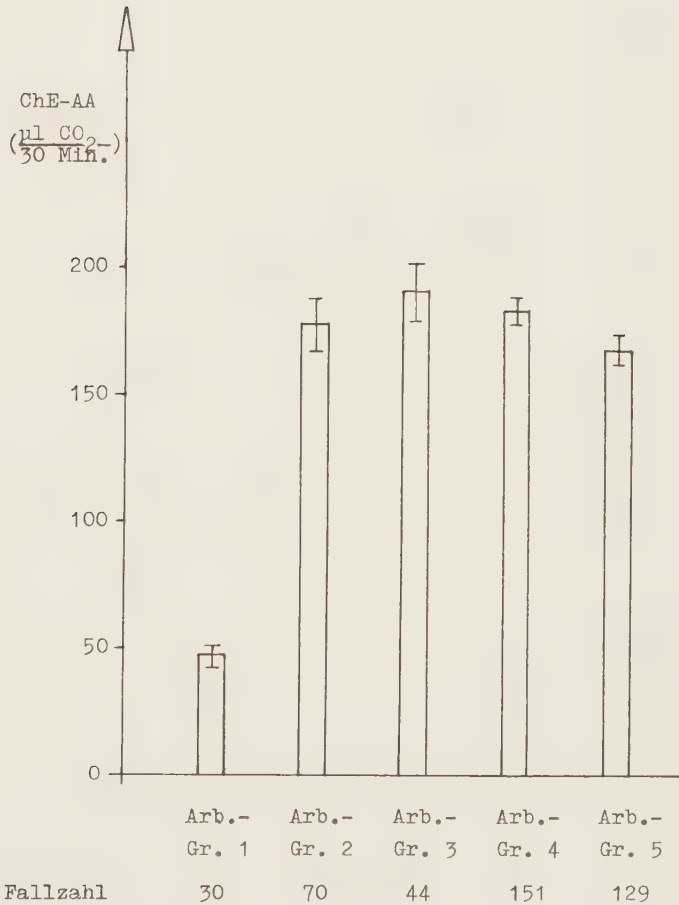
D. ERGEBNISSE

1. Cholinesterase-Ausgangsaktivität

a) Gruppenunterschiede der Cholinesterase-Ausgangs-
aktivität

Zur Prüfung auf Gruppenunterschiede der ChE-AA wurde von den einzelnen Arbeitsgruppen 1 bis 5 getrennt eine einfache Datenbeschreibung durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind auf der folgenden Abbildung 5 und aus der Tabelle 4 ersichtlich. Für diese und alle weiteren statistischen Untersuchungen wurden die Meßergebnisse ausgeblendet, die von Probandenseren ein und derselben Person, aber von einer zweiten Messung in einer anderen Arbeitsgruppe stammten.

Abb. 5: Mittelwerte der Cholinesterase-Ausgangsaktivität von den Arb.-Gr. 1, 2, 3, 4 und 5 mit 95 % Konfidenzbereich $\bar{x}$



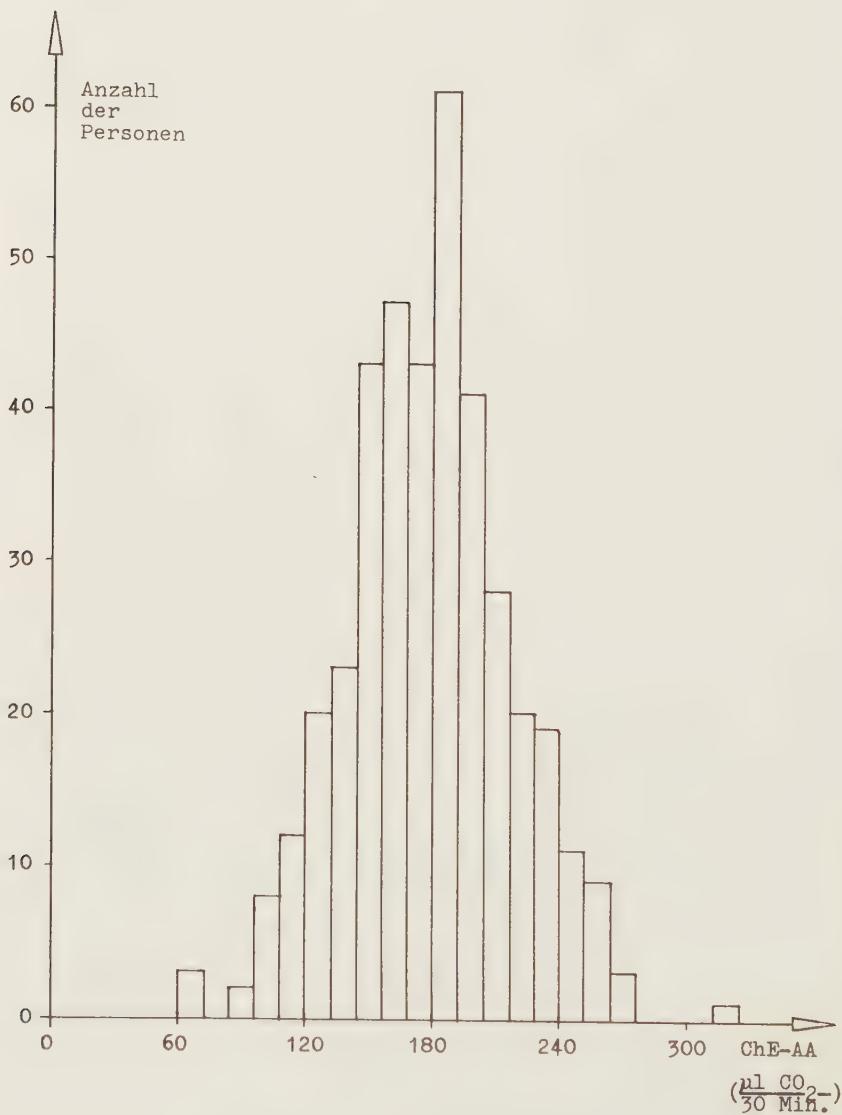
Tab. 4: Mittelwerte der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität mit Standardabweichung s der einzelnen Arbeitsgruppen 1, 2, 3, 4 und 5, der zusammengefaßten Arbeitsgruppen 2-5, und der nach dem Geschlecht getrennten Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen 4, 5 und der zusammengefaßten Arbeitsgruppen 2 - 5.

Mittel- werte	Arb.- Gr. 1	Arb.- Gr. 2	Arb.- Gr. 3	Arb.- Gr. 4	Arb.- Gr. 4 ♂	Arb.- Gr. 4 ♀	Arb.- Gr. 5	Arb.- Gr. 5 ♂	Arb.- Gr. 5 ♀	Arb.- Gr. 2-5 ♂	Arb.- Gr. 2-5 ♀
ChE-AA ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$)	46,97	177,56	190,95	183,47	191,06	160,06	168,06	186,05	160,56	178,21	163,09
Standard- abweichung s	10,83	43,87	38,96	35,06	33,78	28,19	36,49	36,15	34,29	38,34	33,78
ChE-RA ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$)	9,99	44,08	51,49	41,70	46,13	28,05	18,26	27,29	14,19	35,54	24,07
Standardab- weichung s	5,06	26,29	25,96	24,73	25,85	14,03	16,77	21,05	12,34	25,97	19,54
Fallzahl n	30	70	44	151	114	37	129	43	86	394	116

Aus der Abbildung 5 ist ersichtlich, daß die ChE-AA-Mittelwerte der Arb.-Gruppen 2, 3, 4 und 5 nahe beieinander liegen und sich im 95 % Konfidenzbereich größtenteils überlappen, während der ChE-AA-Mittelwert der Gruppe 1 erheblich nach unten abweicht. Diese Abweichung dürfte auf andere Arbeitsbedingungen in der Gruppe 1 zurückzuführen sein. Für die weitere statistische Auswertung der ChE-AA wurden deshalb die Meßwerte der Gruppe 1 auf Grund einer zu hohen Abweichung des ChE-AA-Mittelwertes von den ChE-AA-Mittelwerten der einzelnen Arb.-Gruppen 2 - 5 nicht mehr berücksichtigt. Außerdem dürfte das Weglassen der Arb.-Gr. 1, die nur aus 30 Probanden besteht, keinen Einfluß auf die zu untersuchenden Fragestellungen haben. Die ChE-AA-Ergebnisse der Gruppen 2 - 5 dagegen können, da nur geringe Gruppenunterschiede vorliegen, zusammengefaßt und gemeinsam ausgewertet werden. Dies ergibt bei einer Fallzahl $n = 394$ einen Mittelwert der ChE-AA von $178,2 \mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$.

Von den zusammengefaßten ChE-AA-Meßwerten wurde mit Hilfe des STATSYS-Programms PO22 das auf der Abbildung 6 ersichtliche Histogramm angefertigt. Dieses Histogramm läßt auf eine angenäherte Normalverteilung der zusammengefaßten ChE-AA-Werte der Gruppen 2 - 5 schließen.

Abb. 6: Histogramm der Cholinesterase-Ausgangsaktivität
von den zusammengefaßten Arbeitsgruppen 2 - 5
Fallzahl $n = 394$



b) Geschlechtsunterschiede der Cholinesterase-
Ausgangsaktivität

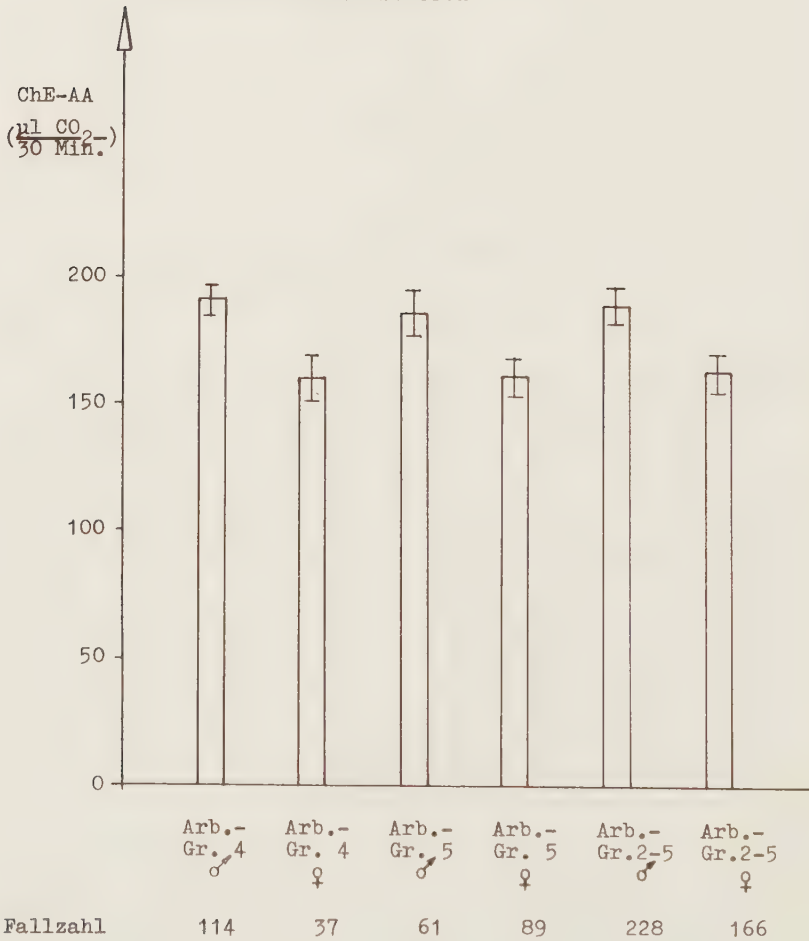
Zur Prüfung auf Geschlechtsabhängigkeit der ChE-AA wurden die Meßwerte der einzelnen Arb.-Gruppen 4 und 5 herangezogen, da in beiden Arbeitsgruppen mit je 150 und 151 Probanden die größte untersuchte Serenanzahl vorlag. Außerdem wurden durch diese gruppenweise Untersuchung geringfügig vorhandene Gruppenunterschiede ausgeschaltet.

Ergänzend zu den Ergebnissen der einzelnen Gr. 4 und 5 wurden die ChE-AA-Meßwerte der zusammengefaßten Gruppen 2 - 5 gemeinsam ausgewertet.

Die zur Untersuchung auf Geschlechtsabhängigkeit ausgewählten Meßergebnisse wurden dazu nach dem Geschlecht getrennt und mit dem Programm PO20 ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 7 dargestellt.

Abb. 7: Mittelwerte der Cholinesterase-Ausgangsaktivität von den einzelnen Arb.-Gr. 4, 5 und den zusammengefaßten Arb.-Gr. 2 - 5 der nach dem Geschlecht getrennten Meßergebnisse, mit 95 % Konfidenzbereich



Aus den in Abbildung 7 dargestellten Mittelwerten der ChE-AA sind deutlich Geschlechtsunterschiede zu erkennen. Die Mittelwerte der ChE-AA von den Frauen sind um etwa 15 % niedriger als die der Männer.

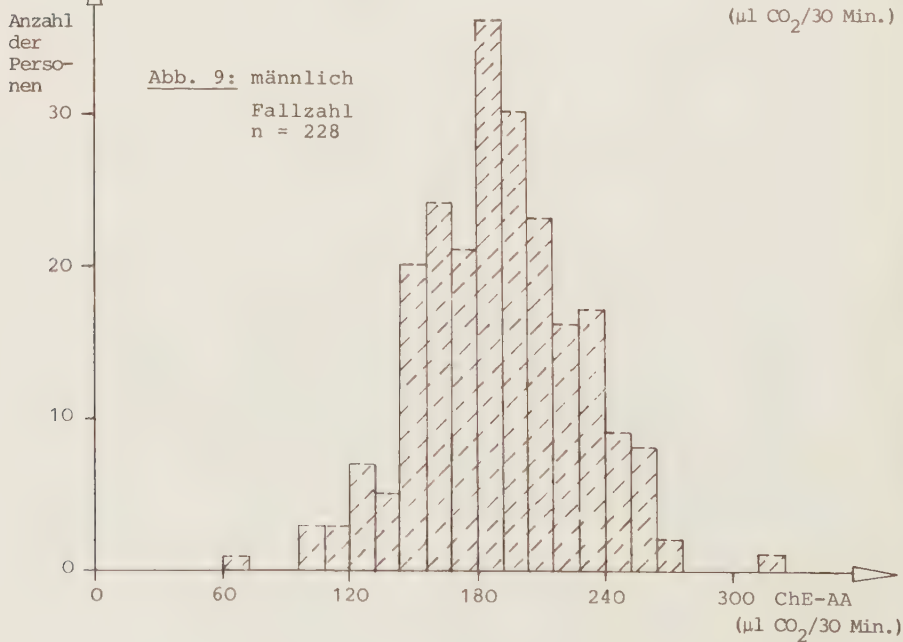
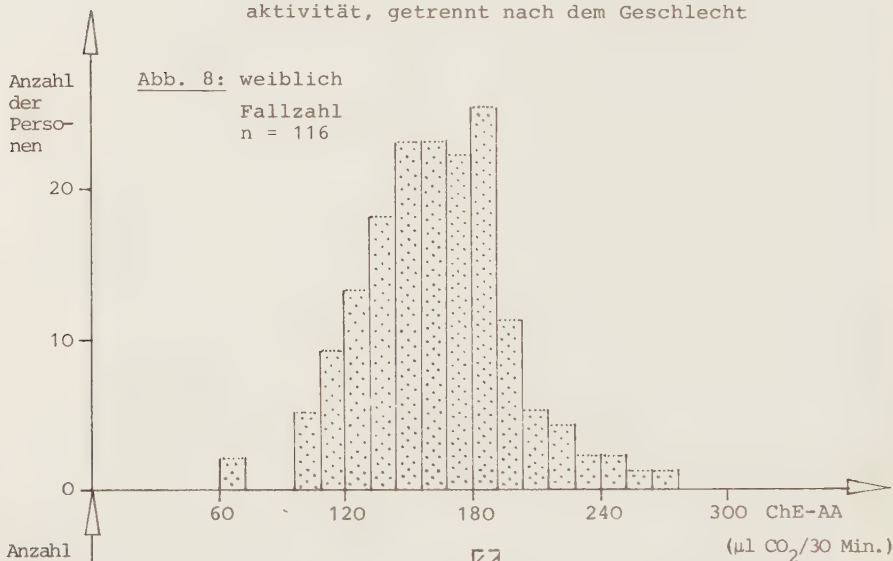
Die in der Abbildung 6 zwischen den einzelnen Arb.-Gr. 2, 3, 4 und 5 noch deutlich erkennbaren Mittelwertsunterschiede der ChE-AA sind bei den Mittelwerten der nach Geschlecht getrennten ChE-AA der gleichen Arbeitsgruppen nur noch geringfügig vorhanden.

Damit erklären sich diese Mittelwertsunterschiede der ChE-AA, die zwischen den mit 151 und 129 Probanden jeweils am meisten besetzten Arbeitsgruppen 4 und 5 klar vorhanden sind, als eindeutig geschlechtsbedingt.

Der gegenüber der Arb.-Gr. 5 höhere Mittelwert der ChE-AA von der Arb.-Gr. 4 wird hervorgerufen durch das Überwiegen der männlichen Probanden (mit dem gegenüber den Frauen höheren Mittelwert der ChE-AA). In der Arb.-Gr. 5 sind dagegen die weiblichen Probanden in der Überzahl, wodurch der Mittelwert der ChE-AA dieser Gruppe nach unten gedrückt wird.

Die noch vorhandenen geringfügigen Unterschiede zwischen den nach Geschlecht getrennten Ergebnissen der Arbeitsgruppen 4 und 5 in der Abbildung 7 sind sehr wahrscheinlich auf Gruppenunterschiede zurückzuführen. Diese Unterschiede sind aber so gering, daß die nach dem Geschlecht getrennten Meßergebnisse der Arbeitsgruppen 2, 3, 4 und

Abb. 8 u. 9: Histogramme der zusammengefaßten Arb.-
Gr. 2 - 5 der Cholinesterase-Ausgangs-
aktivität, getrennt nach dem Geschlecht



5 zusammengefaßt werden können. Die aus diesen zusammengefaßten Ergebnissen erhaltenen Histogramme sind in der Abb. 8 und 9 dargestellt.

Sowohl das ChE-AA-Histogramm der weiblichen Probanden als auch das der männlichen zeigt jedes für sich eine angenäherte Normalverteilung. Außerdem ist aus Abbildung 8 und 9 ersichtlich, daß das ChE-AA-Histogramm der Frauen sich über einen Bereich von niedrigeren ChE-AA-Werten erstreckt als das der Männer.

Damit bestätigen diese beiden nach dem Geschlecht getrennten Histogramme die in der Abbildung 7 festgestellten Geschlechtsunterschiede der ChE-AA.

c) Unterschiede der Cholinesterase-Ausgangsaktivität,
in Abhängigkeit von den Blutgruppen des ABO-Systems
und dem Rh-Faktor

Für die Untersuchung auf eine Abhängigkeit der ChE-AA von den Blutgruppen des ABO-Systems und des Rh-Faktors wurden wieder die Meßergebnisse der Arbeitsgruppe 4 herangezogen, weil sich in dieser Gruppe die größte Probandenzahl befindet. Nachdem eine Geschlechtsabhängigkeit der ChE-AA festgestellt wurde, erfolgte die Untersuchung der ChE-AA-Werte der Gr. 4 getrennt nach männlichen und weiblichen Probanden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 10 zusammengestellt.

Aus den in Abbildung 10 dargestellten Ergebnissen sind innerhalb der männlichen und weiblichen Probandengruppe keine Hinweise auf eine Abhängigkeit der ChE-AA von den Blutgruppen des ABO-Systems oder vom Rh-Faktor zu erkennen. Zu berücksichtigen ist dabei, daß die Gruppe der Frauen in den einzelnen Blutgruppen wesentlich kleiner ist als die der Männer.

d) Altersabhängigkeit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität

Zur Untersuchung einer Altersabhängigkeit der ChE-AA wurde mit dem PLOT-Programm das in Abbildung 11 ersichtliche Korrelationsdiagramm der ChE-AA in Abhängigkeit vom Alter erstellt.

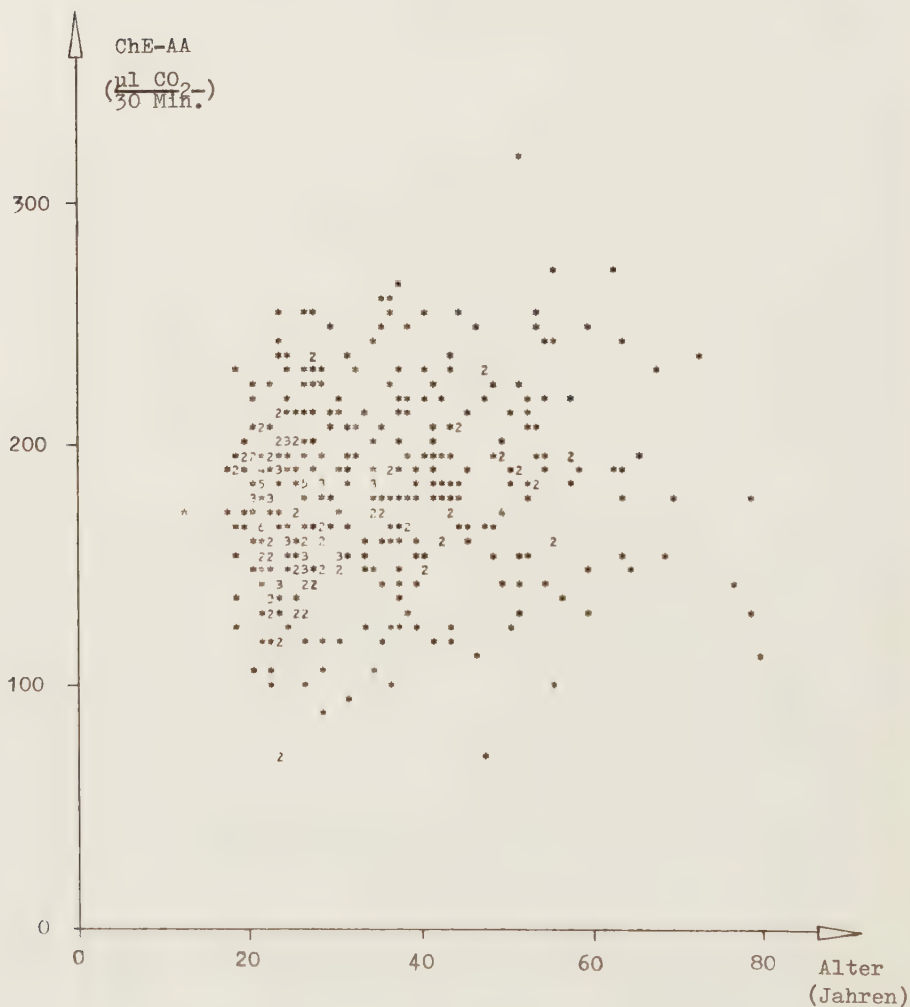
Auf Grund des errechneten KK $r = 0,128$ ist eine geringe Altersabhängigkeit der ChE-AA zu vermuten.

Dieser KK ist jedoch nicht signifikant von Null verschieden. Deshalb ist die Altersabhängigkeit nicht genügend gesichert.

Abb. 11: Korrelationsdiagramm der Cholinesterase-Ausgangsaktivität in Abhängigkeit vom Alter der zusammengefaßten Arbeitsgruppen 2 - 5

Fallzahl $n = 394$

Korrelationskoeffizient $r = 0,128$



e) Altersabhängigkeit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität, getrennt nach dem Geschlecht

In den Abbildungen 8 und 9 sind Geschlechtsunterschiede der ChE-AA gefunden worden. Deshalb wurde die ChE-AA auch nach den Geschlechtern getrennt auf eine Altersabhängigkeit hin untersucht.

Herangezogen wurden dazu die nach dem Geschlecht getrennten Meßergebnisse der Gruppe 4, der Gruppe 5 und die der zusammengefaßten Gruppen 2 - 5. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tab. 5: Korrelationskoeffizienten der Cholinesterase-Ausgangsaktivität in Abhängigkeit vom Alter, getrennt nach dem Geschlecht, der Arb.-Gr. 4, 5 und 2 - 5

Korrelationskoeffizienten	Gr.4 ♂	Gr.4 ♀	Gr.5 ♂	Gr.5 ♀	Gr.2-5 ♂	Gr.2-5 ♀
ChE-AA / Alter	0,313	-0,149	0,142	0,158	0,136	0,136
Signifikanz	signifikant von Null verschieden		nicht signifikant von Null verschieden			
Fallzahl	114	37	61	89	228	166

Die erhaltenen und in Tabelle 5 wiedergegebenen Korrelationskoeffizienten sind etwas widersprüchlich.

Die KK-en der nach dem Geschlecht getrennten Ergebnisse der Gr. 5 sind nicht signifikant von Null verschieden und fast gleich.

Bei der Gr. 4 dagegen wurde bei den männlichen Probanden der sehr signifikant von Null verschiedene Korrelationswert 0,313 ($P = < 0,001$) der ChE-AA zum Alter gefunden, der auf eine deutliche Abhängigkeit der ChE-AA vom Alter hinweisen würde. Bei den weiblichen Probanden der gleichen Gruppe wurde dagegen der nicht signifikant von Null verschiedene Wert von -0,149 erhalten, von dem wieder auf keine Altersabhängigkeit zu schließen ist. Dieses zwischen den Gr. 4 und 5 widersprüchliche Ergebnis ist nicht zu erklären.

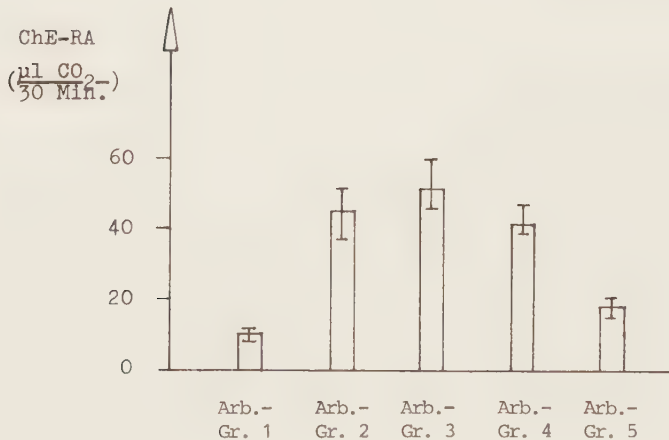
Die KK-en ChE-AA/Alter der nach dem Geschlecht getrennten Meßergebnisse der zusammengefaßten Arb.-Gr. 2-5 sind dagegen von ähnlicher Größenordnung wie diejenigen der Arb.-Gr. 5 allein. Sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen wurde der nicht signifikant von Null verschiedene Wert von 0,136 erhalten. Daraus wäre wieder wie bei der Gr. 5 auf keine Geschlechtsbeeinflussung einer vermuteten geringen Abhängigkeit der ChE-AA vom Alter zu schließen.

2. Cholinesterase-Restaktivität (ChE-RA) nach Zusatz von DFP

a) Gruppenunterschiede der Cholinesterase-Restakti- vität

Nach Zusatz von DFP zur Serum-ChE senkte sich die ChE-AA innerhalb der einzelnen Arbeitsgruppen auf die in der Abbildung 12 dargestellten ChE-RA-Mittelwerte.

Abb. 12: Mittelwerte der Cholinesterase-Restaktivität
der Arb.-Gr. 1, 2, 3, 4 und 5
mit 95 % Konfidenzbereich I



	Gr.1	Gr.2	Gr.3	Gr.4	Gr.5
ChE-RA ($\frac{\mu\text{l CO}_2}{30 \text{ Min.}}$)	9,99	44,08	51,49	41,70	18,26
Fallzahl	30	70	44	151	129

Tab. 6: DFP-Konzentration in den Arb.-Gr.1,2,3,4 u. 5

	Gr. 1	Gr.2	Gr.3	Gr.4	Gr.5
DFP-Konzentration im Inkubations- ansatz ($\times 10^{-9} \text{ Mol/l}$)	7,21	7,21	5,41	4,81	5,90

Die Unterschiede der ChE-AA-Mittelwerte zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen wird neben der geschlechtsbedingten unterschiedlich hohen ChE-AA (Männer und Frauen sind in den Gruppen unterschiedlich stark vertreten) vor allem durch die in den einzelnen Arbeitsgruppen unterschiedlich hoch eingesetzte DFP-Konzentration im Inkubationsansatz bedingt sein. Die in den einzelnen Gruppen angewandte DFP-Konzentration ist in der Tabelle 6 zusammengestellt.

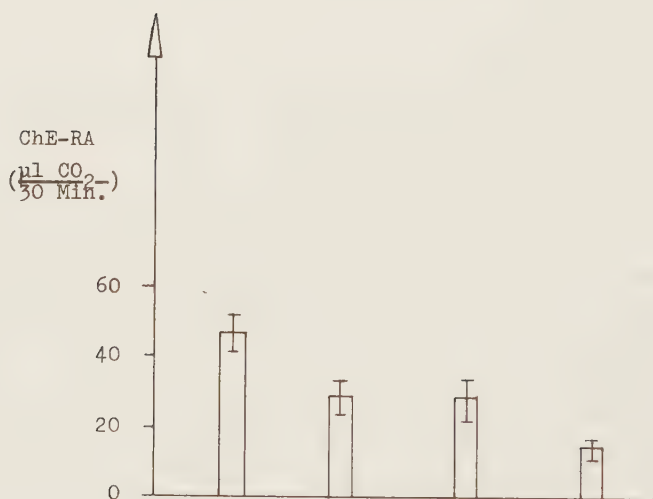
Für statistische Untersuchungen der ChE-RA ist es deshalb

auf Grund der verschieden hohen DFP-Konzentration in den einzelnen Arbeitsgruppen notwendig, jeweils nur die Meßergebnisse einer Arbeitsgruppe heranzuziehen oder bei der Auswertung den Einfluß der Arbeitsgruppe zu berücksichtigen. Deshalb wurden für die weitere Untersuchung vor allem die Arbeitsgruppen 4 und 5 verwendet, die mit je 150 und 151 Probanden die größte Fallzahl aufwiesen.

b) Geschlechtsunterschiede der Cholinesterase-Rest-
aktivität

Bei einer Probandentrennung nach dem Geschlecht in den Arb.-Gr. 4 und 5 wurden die in der Abbildung 13 wiedergegebenen Mittelwerte der Cholinesterase-Restaktivität erhalten.

Abb. 13: Mittelwerte der nach dem Geschlecht getrennten
Cholinesterase-Restaktivitäten der einzelnen
Arb.-Gr. 4 und 5
mit 95 % Konfidenzbereich I



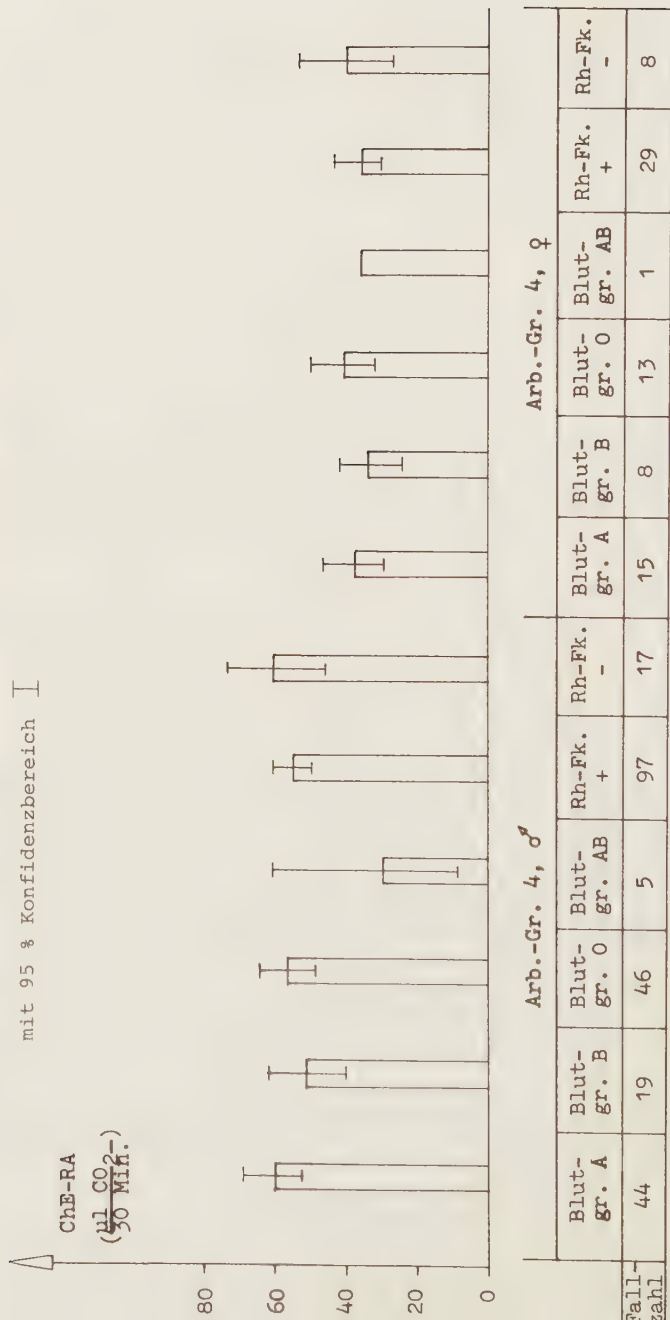
	Gr. 4 ♂	Gr. 4 ♀	Gr. 5 ♂	Gr. 5 ♀
ChE-RA ($\frac{\mu\text{l CO}_2}{30 \text{ Min.}}$)	46,13	28,05	27,29	14,19
Fallzahl	114	37	61	89

Bei den aus der Abbildung 13 ersichtlichen Ergebnissen finden sich bei den männlichen Personen höhere Mittelwerte der ChE-RA als bei den weiblichen. Zurückzuführen ist dies auf die bereits im Durchschnitt höhere ChE-AA der männlichen gegenüber den weiblichen Probanden, die deshalb dann zu einem höheren Mittelwert der ChE-RA der Männer führt. Im Laufe der weiteren statistischen Untersuchung wurde eine starke geschlechtsabhängige Korrelation der ChE-RA mit der ChE-AA gefunden. Dies bedeutet bei Übertragung auf die vorliegenden Mittelwerte der ChE-RA, daß bei höheren Mittelwerten der ChE-AA, wie bei den Männern vorhanden, auch höhere Mittelwerte der ChE-RA als bei den Frauen zu erwarten sind (siehe Seite 77).

c) Unterschiede der Cholinesterase-Restaktivität,
in Abhängigkeit von den Blutgruppen des ABO-
Systems und dem Rh-Faktor

Die Meßergebnisse der Gruppe 4 wurden getrennt nach dem Geschlecht auf eine Abhängigkeit von den Blutgruppen des ABO-Systems und dem Rh-Faktor hin überprüft. Die erhaltenen Werte sind in der Abbildung 14 zusammengestellt.

Abb. 14: Mittelwerte der Cholinesterase-Restaktivität der Arb.-Gr. 4, getrennt nach dem Geschlecht, den Blutgruppen des ABO-Systems und des Rh-Faktors, mit 95 % Konfidenzbereich I



Aus den in Abbildung 14 dargestellten Werten sind sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Personen keine Hinweise auf eine Abhängigkeit der ChE-RA von den Blutgruppen des ABO-Systems und des Rh-Faktors vorhanden.

3. Korrelationen der Cholinesterase-Restaktivität nach
DFP-Zusatz zum Serum

a) Korrelation der Cholinesterase-Restaktivität mit
der Cholinesterase-Ausgangsaktivität

Zur Untersuchung einer Abhängigkeit der ChE-RA von der ChE-AA wurden zur Ausschaltung der Gruppenunterschiede von den Meßwerten der einzelnen Gruppen 4, 3, 5 und 2 (angeordnet nach steigender DFP-Konzentration) mit dem PLOT-Programm Korrelationsdiagramme angefertigt. Diese Diagramme sind aus den Abbildungen 15, 16, 17 und 18 ersichtlich.

Abb. 15: Korrelationsdiagramm der Arb.-Gr. 4:

Cholinesterase-Restaktivität in Abhängigkeit
von der Cholinesterase-Ausgangsaktivität

DFP-Konzentration = $4,81 \times 10^{-9}$ Mol/l.

Fallzahl $n = 151$.

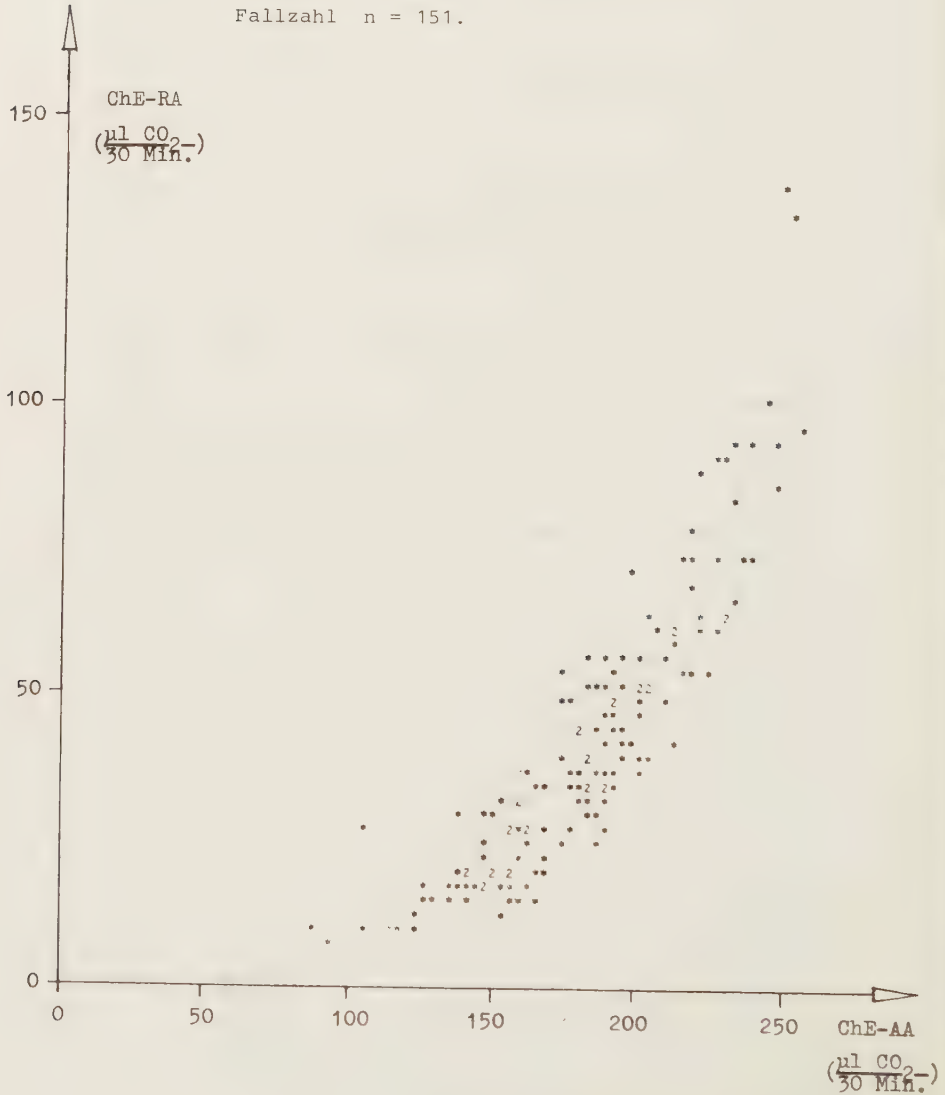


Abb. 16: Korrelationsdiagramm der Arb.-Gr. 3:

Cholinesterase-Restaktivität in Abhängigkeit

von der Cholinesterase-Ausgangsaktivität

DFP-Konzentration = $5,41 \times 10^{-9}$ Mol/l.

Fallzahl n = 44.

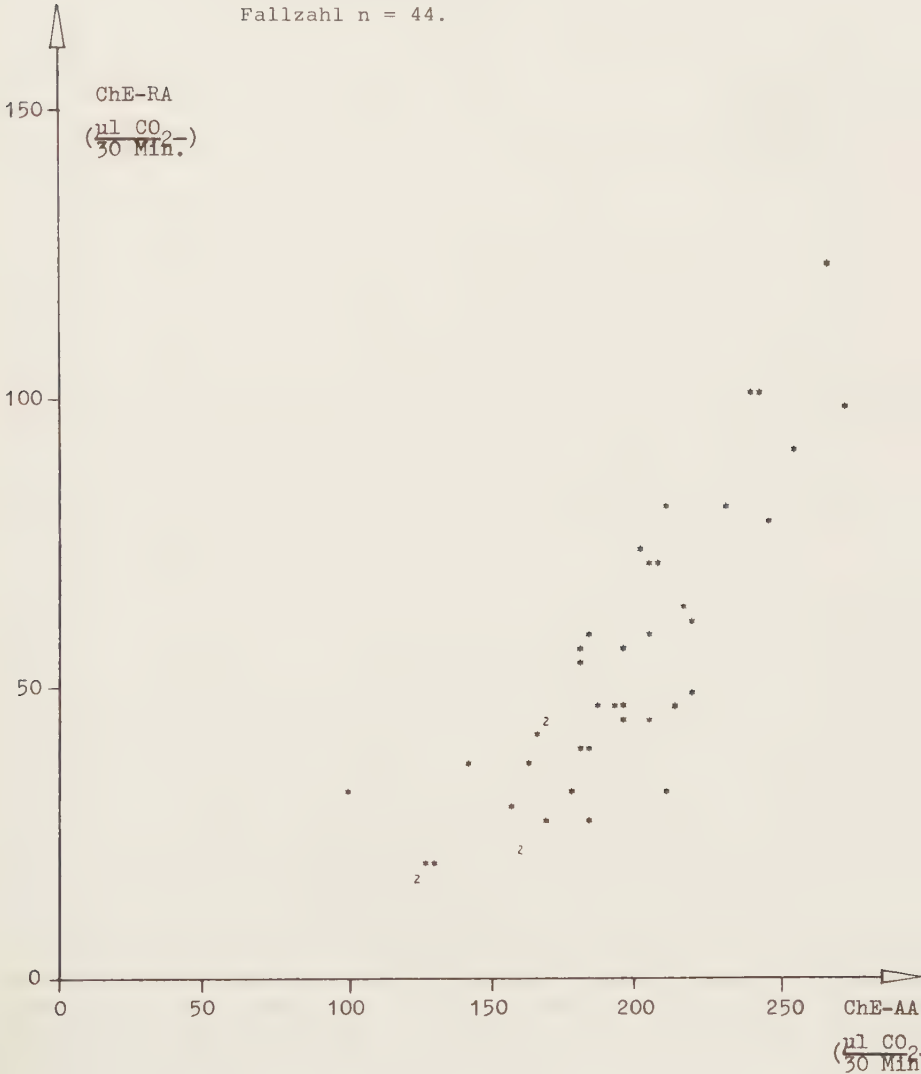


Abb. 17: Korrelationsdiagramm der Arb.-Gr. 5:

Cholinesterase-Restaktivität in Abhängigkeit

von Cholinesterase-Ausgangsaktivität

DFP-Konzentration = $5,90 \times 10^{-9}$ Mol/l.

Fallzahl $n = 129$.

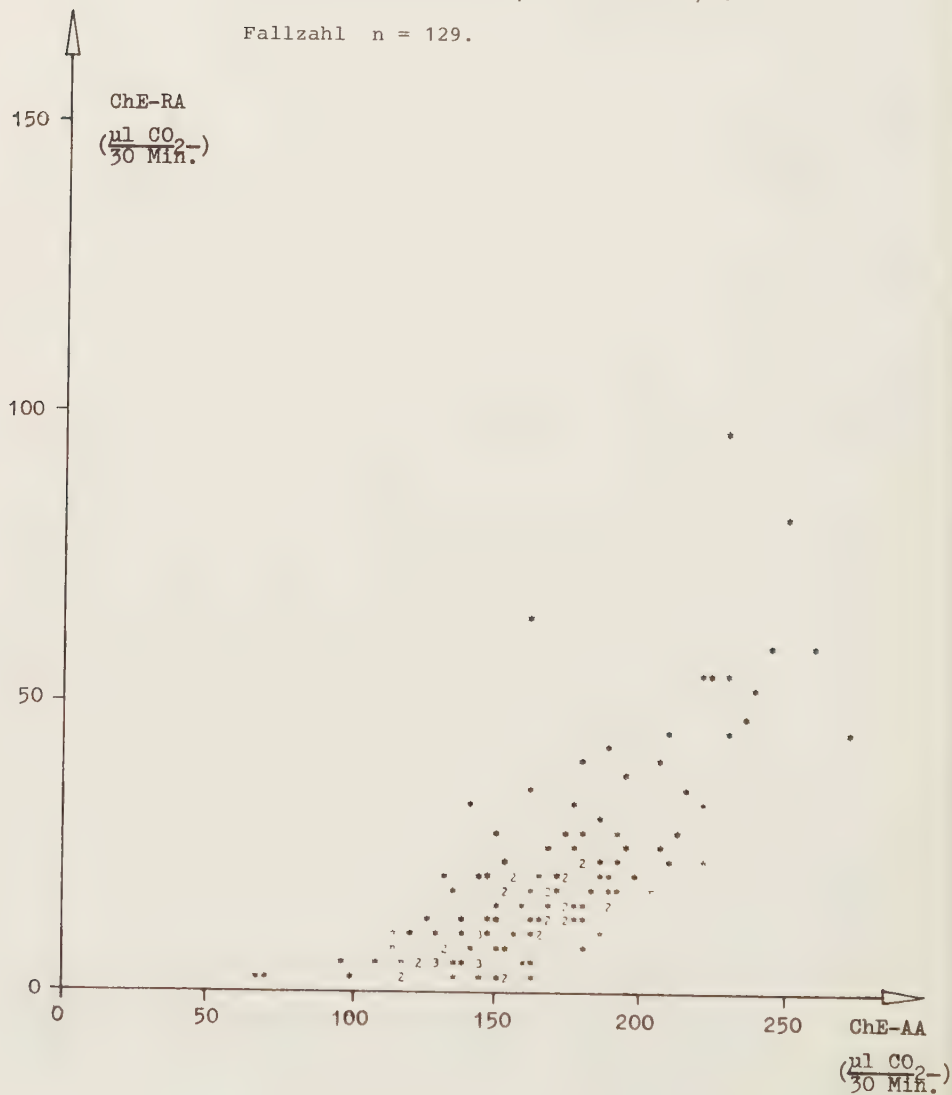
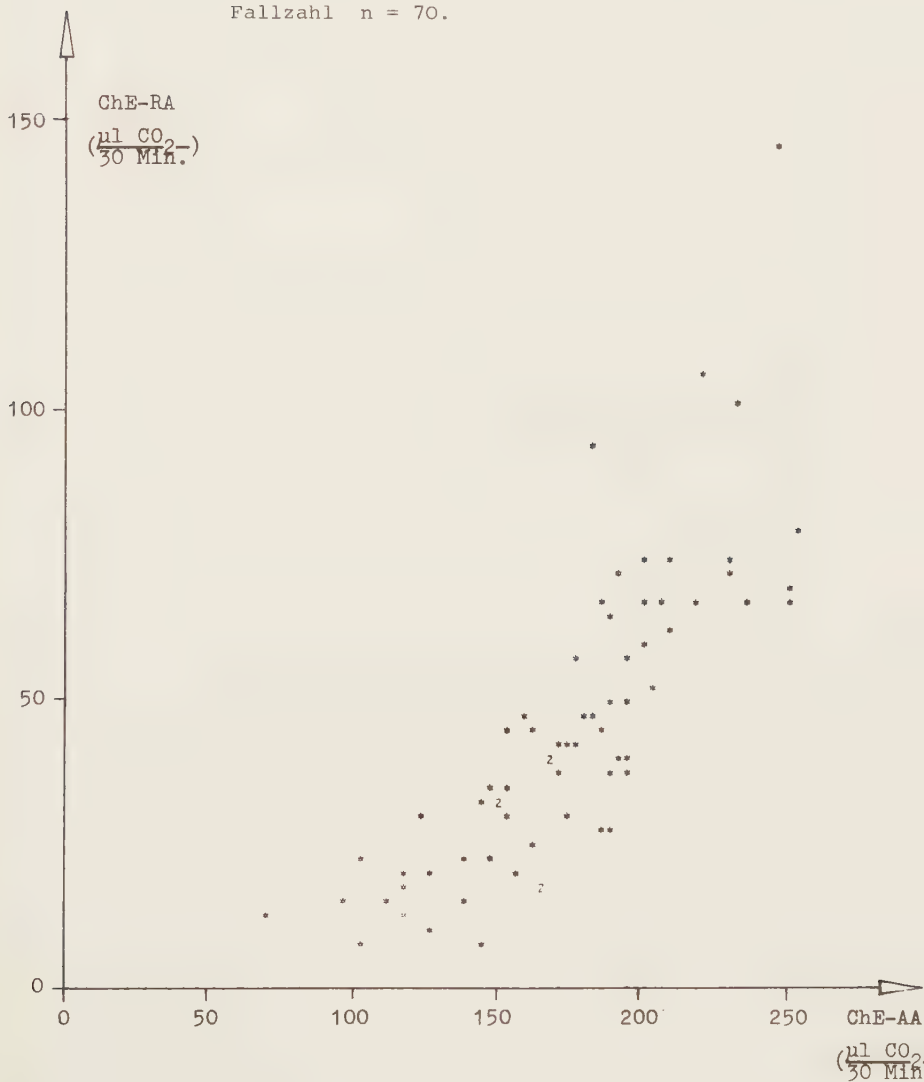


Abb. 18: Korrelationsdiagramm der Arb.-Gr. 2:

Cholinesterase-Restaktivität in Abhängigkeit
von der Cholinesterase-Ausgangsaktivität

DFP-Konzentration = $7,21 \times 10^{-9}$ Mol/l.

Fallzahl $n = 70$.



In den Abbildungen 15, 16, 17 und 18 sind die Korrelationsdiagramme: ChE-RA/ChE-AA der Gruppen 4,3,5 und 2 (angeordnet nach steigender DFP-Konzentration) wiedergegeben. Aus diesen Diagrammen ist unabhängig von der DFP-Konzentration in den einzelnen Gruppen eine deutliche Abhängigkeit der ChE-RA von der ChE-AA zu erkennen. Je größer die ChE-AA eines Serums ist, umso höher ist nach dem in einer Arb.-Gruppe immer gleichen DFP-Zusatz auch die ChE-RA.

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten ChE-RA/ChE-AA bestätigte den aus den Diagrammen ersichtlichen starken Zusammenhang zwischen beiden Größen. In allen Gruppen wurde zwischen den beiden Werten ein sehr signifikant von Null verschiedener Korrelationskoeffizient gefunden. Die Trennung nach männlichen und weiblichen Probanden ergab jeweils bei den Männern eine etwas höhere Korrelation als bei den Frauen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Tab. 7: Korrelationskoeffizienten Cholinesterase-Restaktivität/Cholinesterase-Ausgangsaktivität der einzelnen Gruppen 4 und 5 und der nach dem Geschlecht getrennten Gruppen 4 und 5. Alle Korrelationskoeffizienten sind signifikant von Null verschieden ($P < 1 \%$).

(s. nächste Seite)

Korrelations- koeffizienten	Arb.-Gr. 4	Arb.-Gr. 5
♂ + ♀	0,883	0,759
Fallzahl	151	150
♂	0,891	0,761
Fallzahl	114	61
♀	0,792	0,729
Fallzahl	37	89
DFP-Konzentration (x 10 ⁻⁹ Mol/l)	4,81	5,90

b) Korrelation der Cholinesterase-Aktivitätssenkung
(ChE-AS) mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität

Im vorangegangenen Abschnitt "Korrelation der ChE-RA mit der ChE-AA" wurde festgestellt, daß zwischen der ChE-AA und der nach Zusatz von DFP bestimmten ChE-RA ein Zusammenhang besteht. Es wurde gefunden, daß die ChE-RA umso höher ist, je größer bereits vorher die ChE-AA war. Eine solche Korrelation kann auf verschiedene Weise zustandekommen. Es kann einmal die ChE-RA (in %) konstant sein oder auch die Aktivitätssenkung (AS = ChE-AA - ChE-RA), wie dies in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt ist. Oder es besteht eine Kombi-

nation aus beiden Möglichkeiten. In allen Fällen stellt in einem Korrelationsdiagramm ChE-RA/ChE-AA (mit Achsenmaßstab 1:1) die 45°-Diagonale eine Grenzlinie dar, oberhalb derer es keine Werte gibt. Maximal kann ein ChE-RA-Wert die Größe des ChE-AA-Wertes erreichen. Dies ist dann der Fall, wenn nach Zusatz von DFP keine ChE-AS eintritt. Dann ist die ChE-RA gleich der ChE-AA und ergibt damit einen Wert auf der 45°-Diagonalen. Alle Werte aber mit einer ChE-AS > 0 kommen unterhalb der 45°-Diagonalen zu liegen.

Abb. 19: Korrelationsdiagramm Cholinesterase-Restaktivität / Cholinesterase-Ausgangsaktivität bei der Annahme einer konstanten Cholinesterase-Restaktivität (in %).

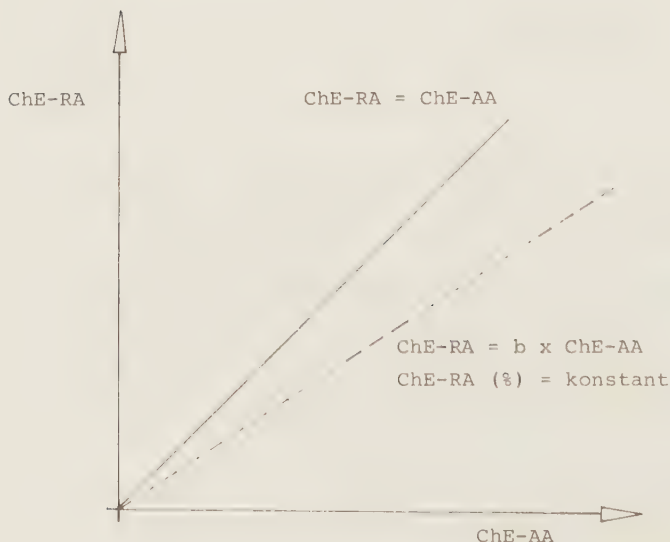
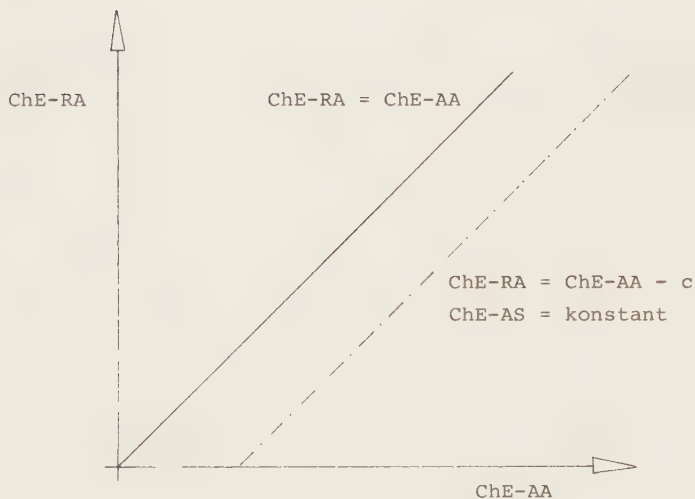


Abb. 20: Korrelationsdiagramm Cholinesterase-Restaktivität/Cholinesterase-Ausgangsaktivität bei der Annahme einer konstanten Cholinesterase-Aktivitätssenkung ($\text{ChE-AS} = \text{ChE-AA} - \text{ChE-RA}$)



Wir wollten nun genauer untersuchen, ob unabhängig von der Größe der ChE-AA die Differenz $\text{ChE-RA} - \text{ChE-AA}$ immer gleich und damit die ChE-AS konstant ist. Dazu wurden von den einzelnen Arb.-Gruppen 4, 3, 5 und 2 (steigende DFP-Konzentration) die in den Abbildungen 21, 22, 23 und 24 enthaltenen Korrelationsdiagramme $\text{ChE-AS}/\text{ChE-AA}$ erstellt.

Abb. 21: Korrelationsdiagramm der Arb.-Gr. 4:

Cholinesterase-Aktivitätssenkung in Abhängig-
keit von der Cholinesterase-Ausgangsaktivität.

DFP-Konzentration = $4,81 \times 10^{-9}$ Mol/l.

Fallzahl n = 151.

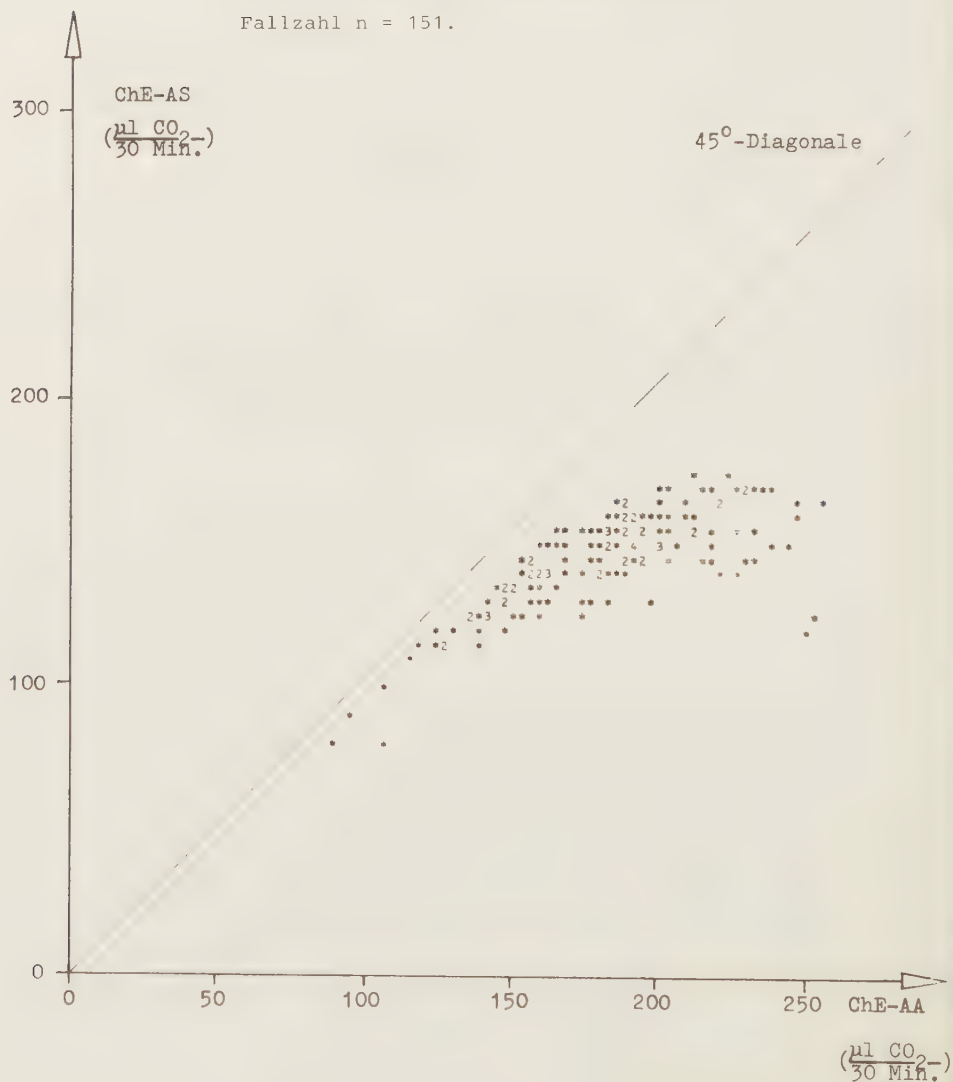


Abb. 23: Korrelationsdiagramm der Arb.-Gr. 5:

Cholinesterase-Aktivitätssenkung in Abhängig-
keit von der Cholinesterase-Ausgangsaktivität.

DFP-Konzentration = $5,90 \times 10^{-9}$ Mol/l.

Fallzahl n = 129.

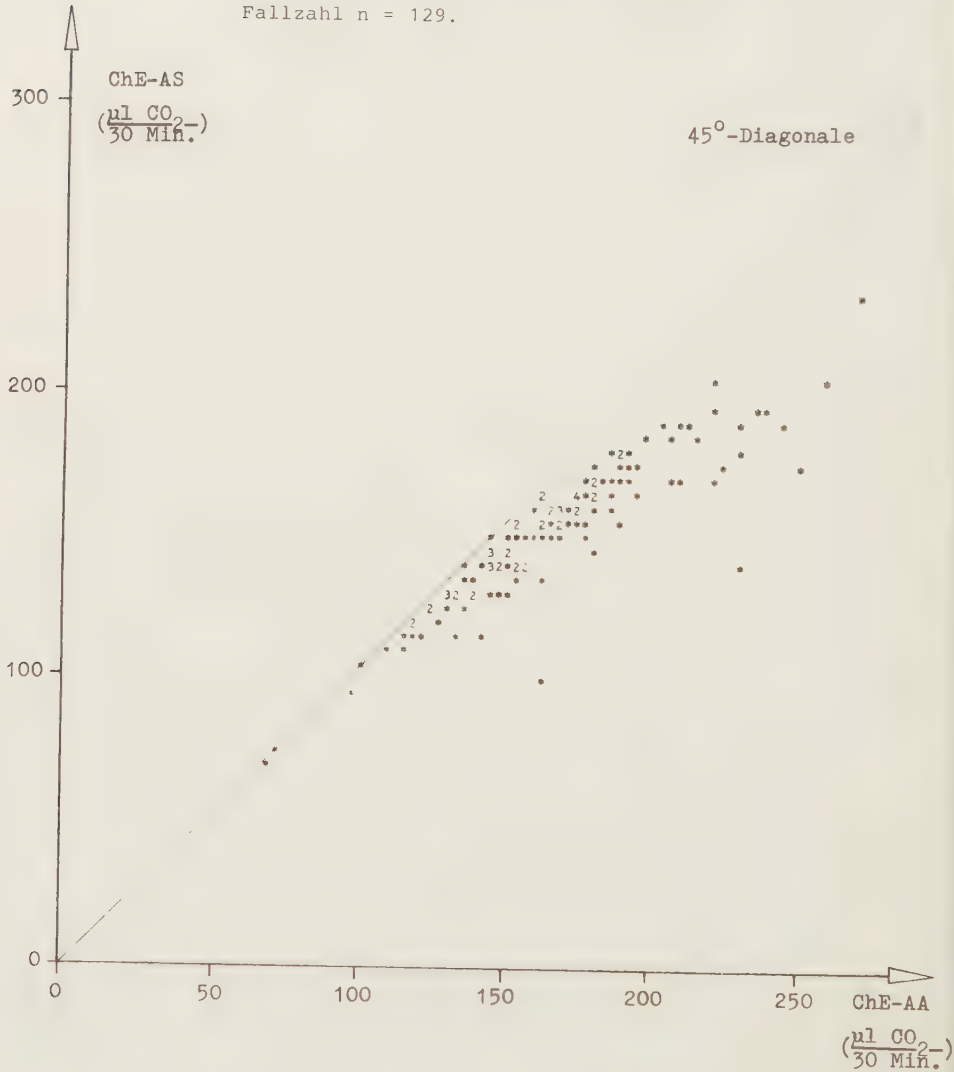
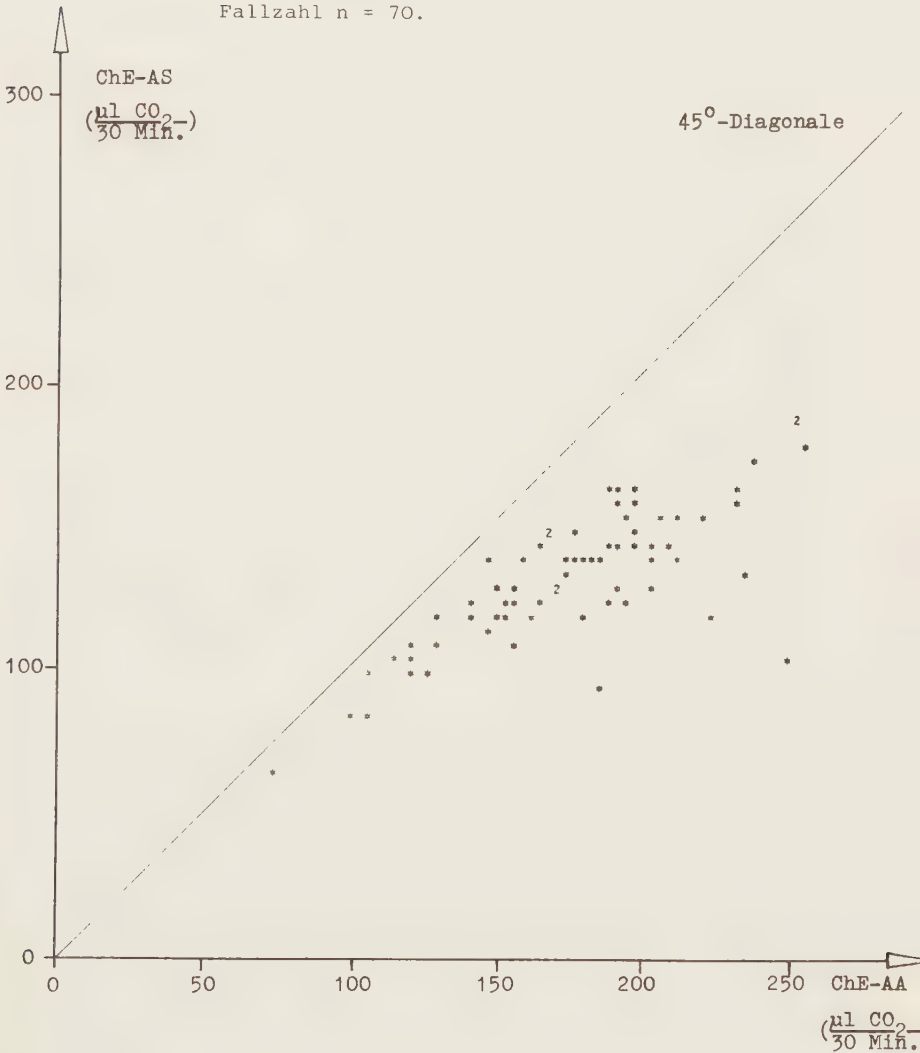


Abb. 24: Korrelationsdiagramm der Arb.-Gr. 2:

Cholinesterase-Aktivitätssenkung in Abhängig-
keit von der Cholinesterase-Ausgangsaktivität.

DFP-Konzentration = $7,21 \times 10^{-9}$ Mol/l.

Fallzahl $n = 70$.



Die erhaltenen Korrelationsdiagramme sind charakterisiert durch eine 45° -Diagonale, oberhalb derer keine Werte liegen. Dies wird dadurch bewirkt, daß die $\text{ChE-AS} = \text{ChE-AA} - \text{ChE-RA}$ maximal die Größe der ChE-AA erreichen kann, wenn die ChE-RA Null ist. Dann liegt der ChE-AS -Wert auf der Diagonalen und kann diese nicht überschreiten. Bei einer Unabhängigkeit der ChE-AS von der ChE-AA würden die Werte im Korrelationsdiagramm im Idealfall eine Parallele zur Abszisse ergeben.

Bei den erhaltenen Diagrammen fällt nun auf, daß sie sich in zwei Teile gliedern, und zwar einmal in einen aufsteigenden Ast im Bereich der niedrigeren ChE-AA . Hier korreliert die ChE-AS stark mit der ChE-AA . Je höher in diesem Teil die ChE-AA ist, umso größer ist dann die ChE-AS . Dieser aufsteigende Werteast reicht im Diagramm der Gr. 4 bis zu einer ChE-AA von ca. 150 μl . Dann schwenken die Werte in einen zur Abszisse parallelen Bereich über, in dem die ChE-AS weitgehend unabhängig von der ChE-AA ist.

Dies wiederholt sich in den Korrelationsdiagrammen der Gr. 3, 5 und 2, die eine höhere DFP-Konzentration bei der ChE-RA -Bestimmung verwendeten. Gegenüber dem Diagramm der Gr. 4 ist dabei zu beobachten, daß bei höherer verwendeter DFP-Konzentration die Werte erst bei höheren

ChE-AA in einen zur x-Achse parallelen Bereich einschwenken. Bei der Gr. 5 ist dies erst bei einer ChE-AA von etwa $200 \mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$ gegenüber etwa $175 \mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$ bei der Gr. 4 der Fall. Über $200 \mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$ sind jedoch nur noch wenige Werte vorhanden, so daß dieser parallele Bereich der ChE-AS-Werte bei der Gr. 5 nicht so deutlich zum Ausdruck kommt. Im Bereich niedrigerer ChE-AA-en (der je nach Arb.-Gr. bis 150 oder bis $200 \mu\text{l CO}_2/30 \text{ Min.}$ reicht), liegen die ChE-AS-Werte nahe der 45° -Diagonalen und korrelieren deshalb stark mit der ChE-AA. In diesem Bereich ist die ChE-RA durch fast vollständige Blockade der ChE durch DFP sehr niedrig, wodurch die ChE-RA-Werte nahe der 45° -Diagonalen zu liegen kommen.

Im darüber liegenden Bereich höherer ChE-AA schwenken die ChE-AS-Werte in eine Parallele zur ChE-AA-Abszisse ein, d.h. die ChE-AS wird unabhängig von der ChE-AA. Der Punkt, an dem der Übergang vom aufsteigenden in den parallelen Teil erfolgt, wird bestimmt durch die bei der ChE-RA-Untersuchung verwendete DFP-Konzentration. In diesem parallelen Bereich wird soviel ChE blockiert, wie der zugesetzten DFP-Menge entspricht. Bei Gr. 4 weniger, bei Gr. 3, 5 und 2 mehr, entsprechend der verwendeten DFP-Konzentration von $4,8 \times 10^{-9}$, $5,4 \times 10^{-9}$, $5,9 \times 10^{-9}$ und $7,21 \times 10^{-9} \text{ Mol/l.}$

Dies ist so zu deuten, daß im Bereich niedriger ChE-Konzentration (= niedrige ChE-AA) die zugesetzte DFP-Menge eine fast vollständige Enzymblockierung bewirkt. Im Bereich

höherer ChE-Konzentration (= höhere ChE-AA) wird dagegen nur eine entsprechend der zugesetzten DFP-Menge äquivalente ChE-Menge ($\hat{=}$ ChE-AA - ChE-RA = ChE-AS) blockiert. In diesem Bereich ist die durch DFP blockierte ChE fast konstant und nur abhängig von der zugesetzten DFP-Menge. Danach würden bei noch geringerer DFP-Konzentration die Werte der ChE-AS noch früher in einen zur Abszisse parallelen Wertebereich einschwenken und damit auch einen niedrigeren Korrelationskoeffizienten der ChE-AS / ChE-AA ergeben.

Mit noch geringerer DFP-Konzentration wurden 80 menschliche Seren in der Arbeitsgruppe 9 ⁺⁾ mit der Anti-ChE-Technik gemessen. Verwendet wurde eine DFP-Konzentration von $1,57 \times 10^{-9}$ Mol/l. Die von der Arb.-Gr. 9 erhaltenen ChE-AS-Werte schwenken bereits bei einer ChE-AA von 100 μ l CO₂ / 30 Min. in einen zur x-Achse parallelen Bereich über. Dadurch ergibt sich auch ein wesentlich niedrigerer und nicht signifikant von Null verschiedener Korrelationskoeffizient der ChE-AS / ChE-AA von 0,174. Dieser Korrelationskoeffizient der Arb.-Gr. 9 wird in der Tabelle 8 den KK-en der Arb.-Gr. 4 und 5 gegenübergestellt.

⁺⁾ = Die folgenden Ergebnisse der Arb.-Gr.9 verdanke ich Th.JAHN (1980). Sie sind Teil seiner Dissertation.

Tab. 8: Korrelationskoeffizienten Cholinesterase-Aktivitätssenkung / Cholinesterase-Ausgangsaktivität der Arb.-Gr. 5, 4 und 9 (angeordnet nach fallender DFP-Konzentration)

	Arb.-Gr. 5	Arb.-Gr. 4	Arb.-Gr. 9
Korrelationskoeffizienten ChE-AS/ChE-AA	0,902	0,799	0,174
DFP-Konzentration ($\times 10^{-9}$ Mol/l)	5,90	4,81	1,57
	P < 1 %	P < 1 %	nicht signifikant von Null verschieden
Fallzahl	129	151	80

Aus der Tabelle 8 ist ersichtlich, daß mit fallender DFP-Konzentration auch die Korrelation der ChE-AS/ChE-AA abnimmt. Mit der von der Arb.-Gr. 9 verwendeten DFP-Konzentration von $1,57 \times 10^{-9}$ Mol/l befindet man sich nahe dem Bereich, in dem die ChE-Konzentration größer ist als die von DFP. In diesem Bereich wird die blockierte ChE nur durch die zugesetzte DFP-Konzentration bestimmt, so daß

bei gleicher DFP-Konzentration auch die ChE-AS konstant ist. Deshalb fehlt bei der Arb.-Gr. 9 der bei den Meßwerten der Arb.-Gr. 5 und 4 nahe der 45°-Diagonalen liegende und stark korrelierende Werteast fast vollständig. Der Korrelationskoeffizient ChE-AS/ChE-AA senkt sich dadurch von 0,902 bei einer DFP-Konzentration von $5,90 \times 10^{-9}$ Mol/l auf 0,174 bei $1,57 \times 10^{-9}$ Mol/l. Dies bestätigt die Annahme, daß DFP im Überschuß eine vollständige Blockierung der ChE und im Unterschuß nur eine der DFP-Menge äquivalente ChE-Menge blockiert wird. Daraus läßt sich schließen, daß DFP im untersuchten Konzentrationsbereich im menschlichen Serum sehr schnell an Proteine wie z.B. an ChE, gebunden wird und keinem enzymatischen Abbau durch ein "DFP-ase" unterliegt.

Bei diesen vorliegenden Versuchsbedingungen entfaltet eine vielleicht vorhandene "DFP-ase" eine allenfalls so geringe Aktivität, daß dadurch die DFP-Konzentration im Ansatz während der Inkubationszeit nicht mehr merkbar vermindert wurde.

Damit liegen völlig andere Verhältnisse vor als bei der Inkubation mit Paraoxon, wo die sehr aktiven Serumpa-
raoxonasen die Paraoxon-Konzentration und damit das Aus-
maß der ChE-Hemmung stark modifizieren.

4. Korrelationen der Cholinesterase-Restaktivität nach

E 600-Zusatz zum Serum

- a) Direkter Korrelationsvergleich der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP und nach Zusatz von E 600 mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität

+))

Durch Arbeiten von GELDMACHER-V.MALLINCKRODT et al. (1969) und weiterer Autoren ist bestätigt, daß der Abbau von E 600 im menschlichen Serum durch das Enzym "Paraoxonase" erfolgt. Es ist deshalb zur Beantwortung der Frage eines enzymatischen Abbaus durch eine "DFP-ase" von besonderem Interesse, einen Vergleich der ChE-RA nach Zusatz von DFP und nach Zusatz von E 600 durchzuführen. Dabei kann man von der Überlegung ausgehen, daß beim Vorliegen eines enzymatischen Abbaus im menschlichen Serum in beiden Fällen auch eine gleiche oder ähnliche Korrelation zwischen der ChE-RA nach Zusatz von DFP und der ChE-AA und der zwischen der ChE-RA nach Zusatz von E 600 und der ChE-AA bestehen müßte.

Für einen direkten Korrelationsvergleich eignen sich die Meßergebnisse der Gr. 2, die bei 70 Probanden neben der ChE-RA nach Zusatz von DFP auch die nach Zusatz von E 600

+) = Die Meßergebnisse der ChE-RA und der ChE-AA nach Zusatz von DFP und nach Zusatz von E 600 stammen von der Arb.-Gr.2, die sie in beiden Fällen an Seren von ein- und denselben Personen bestimmte.

bestimmte. Die Auswertung dieser Meßergebnisse ergab die Korrelationsdiagramme der Abbildung 18 (nach Zusatz von DFP) und der Abbildung 25 (nach Zusatz von E 600). Die entsprechenden errechneten Korrelationskoeffizienten sind in der Tabelle 9 enthalten.

Abb. 18: Korrelationsdiagramm der Arb.-Gr. 2:

Cholinesterase-Restaktivität in Abhängigkeit
von der Cholinesterase-Ausgangsaktivität

DFP-Konzentration = $7,21 \times 10^{-9}$ Mol/l.

Fallzahl $n = 70$.

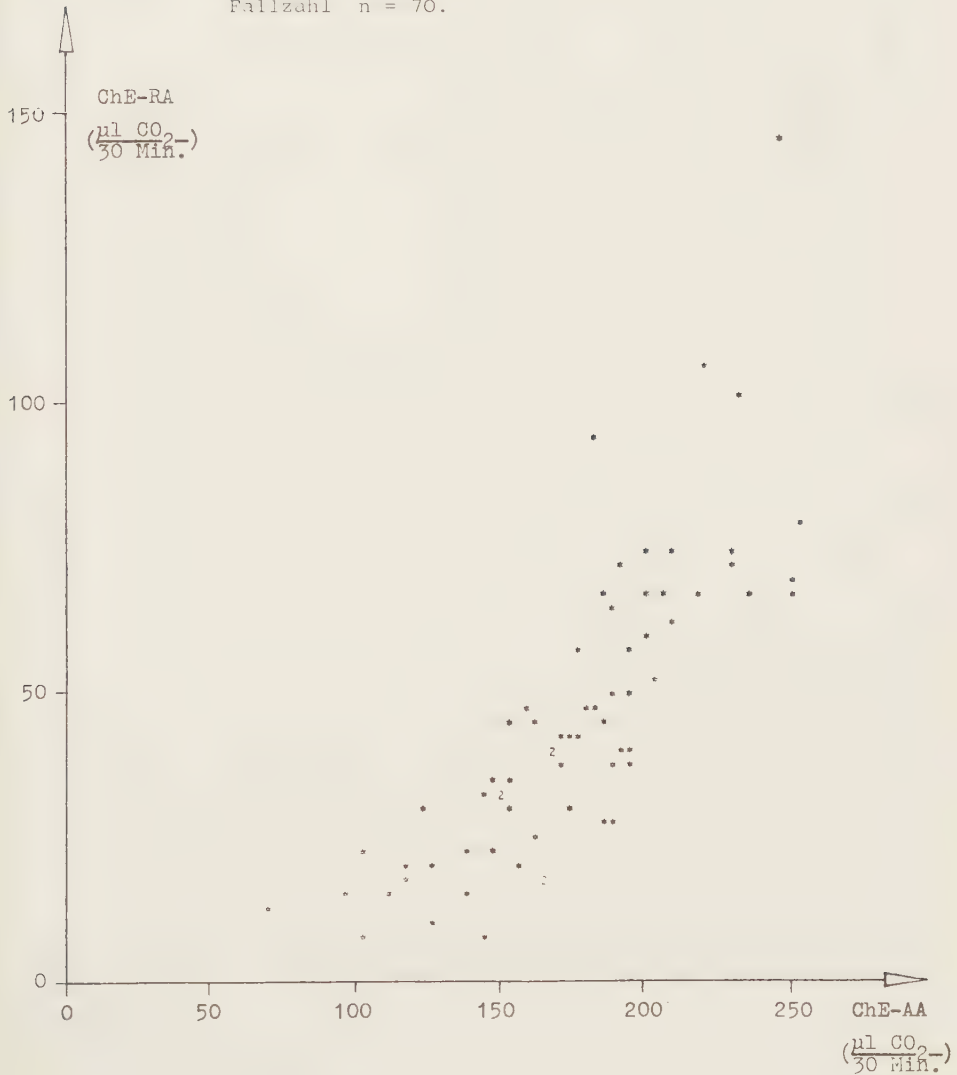
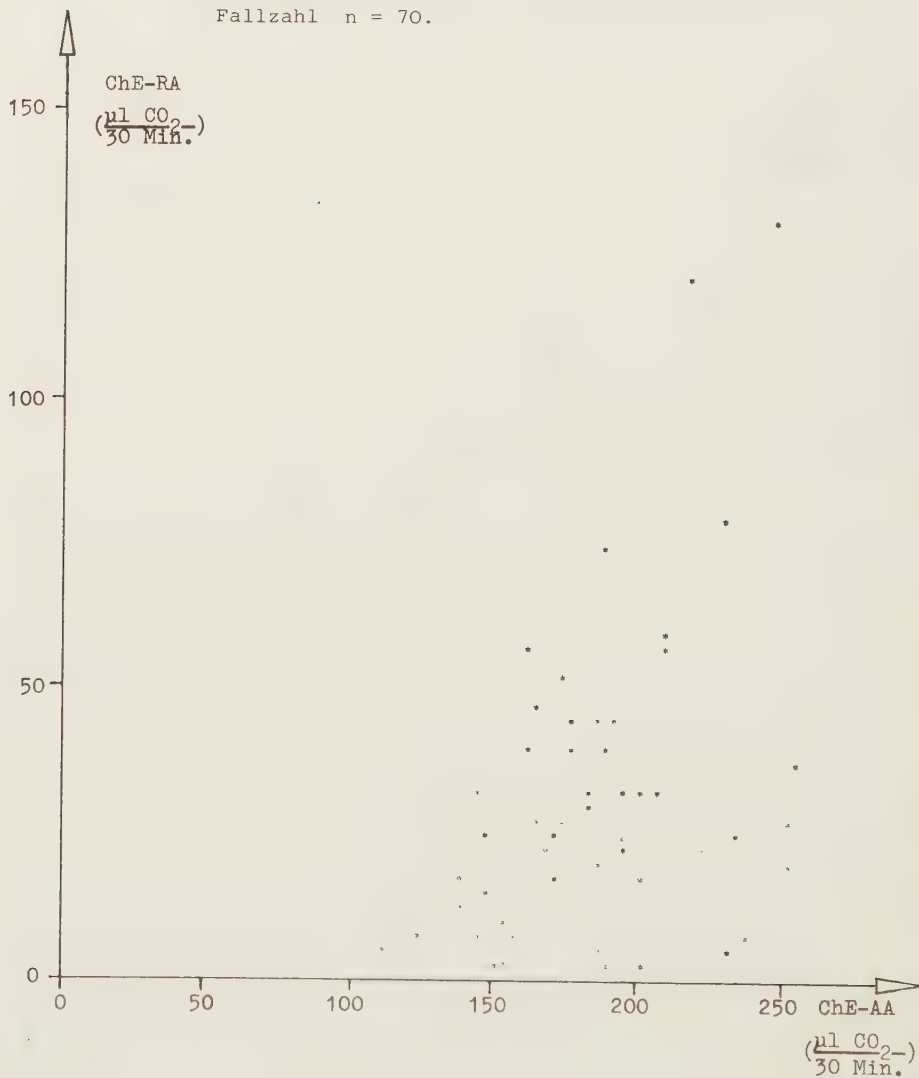


Abb. 25: Korrelationsdiagramm der Arb.-Gr. 2:
Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von
E 600 in Abhängigkeit von der Cholinesterase-
Ausgangsaktivität.
E 600-Konzentration = $3,2 \times 10^{-8}$ Mol/l.
Fallzahl $n = 70$.



Tab. 9: Korrelationskoeffizienten Cholinesterase-Restaktivität / Cholinesterase-Ausgangsaktivität der Arb.-Gr. 2, nach Zusatz von DFP und nach Zusatz von E 600.

Alle Korrelationskoeffizienten sind signifikant von Null verschieden.

Korrelationskoeffizienten	nach Zusatz von DFP	nach Zusatz von E 600
ChE-RA/ChE-AA	0,754	0,478
Fallzahl	70	70
ChE-RA (%) / ChE-AA	0,562	0,344
Fallzahl	70	70

ChE-RA (%) = ChE-RA in Prozent der ChE-AA

Bei einem Vergleich der beiden Korrelationsdiagramme ChE-RA / ChE-AA nach Zusatz von DFP und nach Zusatz von E 600 ist kein prinzipieller Unterschied zu erkennen. Der visuelle Eindruck der Abbildung 25 läßt jedoch eine wesentlich geringere Abhängigkeit der ChE-RA, nach Zusatz von E 600, von der ChE-AA vermuten als dies auf der Abbildung 18 bei der ChE-RA, nach Zusatz von DFP, der Fall ist. Die in Tabelle 9 zusammengefaßten Korrelationskoeffi-

zienten bestätigen nach Zusatz von E 600 eine geringere Korrelation zwischen der ChE-RA und der ChE-AA als nach Zusatz von DFP. Doch die Korrelationswerte sind in beiden Fällen signifikant von Null verschieden. Dies würde eher analog dem enzymatischen Abbau von E 600 auch auf einen solchen beim DFP hinweisen.

- b) Indirekter Korrelationsvergleich der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP und nach Zusatz von E 600 mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität ⁺⁾

Bei dem im vorhergehenden Abschnitt "Direkter Korrelationsvergleich ChE-RA / ChE-AA nach Zusatz von DFP und von E 600" errechnetem Korrelationskoeffizienten der ChE-RA (%) / ChE-AA von $r = 0,344$ nach Zusatz von E 600 aus 70 Meßergebnissen der Arbeitsgruppe 2 ist zu berücksichtigen, daß dieser nicht übereinstimmt mit den Ergebnissen von DUMBACH (1976), "Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumparaoxonase". DUMBACH errechnete aus den Meßergebnissen von 608 Probanden nach Zusatz von E 600 einen Korrelationskoeffizienten ChE-RA (%) / ChE-AA von $r = 0,033$, der auf keine Abhängigkeit der

⁺⁾ = Die Meßergebnisse der ChE-RA und der ChE-AA nach Zusatz von DFP stammen von der Arb.-Gr.2, die nach Zusatz von E 600 sind der Dissertation von DUMBACH (1976) entnommen.

ChE-RA von der ChE-AA hinweist. Dieser Korrelationswert von $r = 0,033$ würde auch besser dem enzymatischen Abbau von E 600 gerecht werden als der Koeffizient der Arb.-Gr. 2 von 0,344, da bei einem erheblichen enzymatischen Abbau von E 600 keine oder nur eine geringe Abhängigkeit der ChE-RA von der ChE-AA zu erwarten wäre. Zu berücksichtigen ist außerdem, daß der Wert von DUMBACH aus Messungen von 608 Personen, der der Arb.-Gr. 2 dagegen nur von 70 Probanden ermittelt wurde. Damit allein läßt sich jedoch nicht die Diskrepanz zwischen den beiden KK erklären. Ein Vergleich des von DUMBACH errechneten Wertes nach Zusatz von E 600 mit den in den Arb.-Gr. 2, 3, 4 und 5 gefundenen Koeffizienten nach Zusatz von DFP ist in der Tabelle 10 zusammengestellt.

Tab. 10: Korrelationskoeffizienten Cholinesterase-Restaktivität (%) / Cholinesterase-Ausgangsaktivität nach Zusatz von DFP von den Arb.-Gr. 4,3,5 u. 2 und nach Zusatz von E 600 aus der Dissertation von DUMBACH (1976)

Korrelationskoeffizienten	nach Zusatz von D F P				nach Zusatz von E 600
	Gr. 4	Gr.3	Gr.5	Gr.2	Dissertation v.DUMBACH
ChE-RA (%) / ChE-AA	0,825	0,671	0,656	0,562	0,033
Signifikanz	Signifikant von Null verschieden				Nicht signifikant von Null verschieden
Fallzahl	151	44	129	70	608

ChE-RA (%) = ChE-RA in Prozent der ChE-AA

Die in der Tabelle 10 enthaltenen Korrelationskoeffizienten weisen darauf hin, daß zwischen der ChE-RA und der ChE-AA nach Zusatz von DFP eine Abhängigkeit und nach Zusatz von E 600 kein Zusammenhang besteht. E 600 wiederum unterliegt im menschlichen Serum einem gesichert geltenden enzymatischen Abbau. Folgt man nun der Überlegung, daß nach Zusatz von DFP nur ein ähnlicher Koeffizient wie nach Zusatz von E 600 auch beim DFP auf einen enzymatischen Abbau hinweisen würde, dann würde der indirekte Vergleich der Korrelationskoeffizienten auf keinen enzymatischen Abbau des DFP's schließen lassen.

5. Korrelation der Cholinesterase-Restaktivität nach Zusatz von DFP mit der Paraoxonase-Aktivität, gemessen nach KRISCH (1968)

Die Messung der Paraoxonase-Aktivität mit der spektral-photometrischen Methode nach KRISCH (1968) wurde zusätzlich zur Bestimmung der ChE-AA und der ChE-RA nach DFP-Zusatz in den Arb.-Gr. 1 (Fallzahl n = 30) und 5 (Fallzahl n = 49) bestimmt. In der Arb.-Gr. 1 waren jedoch die ChE-AA- und die ChE-RA-Meßwerte wesentlich niedriger als die der übrigen Arbeitsgruppen, so daß sie für die statistische Auswertung nicht verwertet wurden. Deshalb wurde auch davon abgesehen, die Paraoxonase-Werte nach KRISCH der Arb.-Gr. 1 für einen Korrelationsvergleich

zu verwenden. Deshalb wurden nur die Paraoxonase-Meßergebnisse der Arb.-Gr. 5 herangezogen. Die dabei erhaltenen Korrelationswerte sind in der Tabelle 11 zusammengestellt.

Tab. 11: Korrelationskoeffizienten ChE-RA (nach Zusatz von DFP) / Paraoxonase-Aktivität nach KRISCH (1968).

Alle Korrelationskoeffizienten sind signifikant von Null verschieden.

Korrelationskoeffizienten	Arb.-Gr. 5
ChE-RA/Paraoxonase	0,376
Fallzahl n	49
ChE-RA (%) / Paraoxonase	0,409
Fallzahl n	49

Der errechnete Korrelationskoeffizient der ChE-RA nach Zusatz von DFP/Paraoxonase-Aktivität, gemessen nach KRISCH, hat den signifikant von Null verschiedenen Wert von $r = 0,376$. Damit wäre ein Zusammenhang zwischen der ChE-RA nach DFP-Zusatz und der Paraoxonase-Aktivität gegeben. Dieses erstaunliche Ergebnis kann vorerst nicht erklärt werden.

E. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Bei der statistischen Auswertung der Cholinesterase-Ausgangsaktivität von menschlichem Serum und der Cholinesterase-Restaktivität nach Inkubation von menschlichem Serum mit DFP bei Verwendung der Anti-Cholinesterase-Technik nach GELDMACHER-V.MALLINCKRODT wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die Cholinesterase-Ausgangsaktivität ist geschlechtsabhängig und liegt bei den Frauen im Durchschnitt ca. 15 % unter der der Männer.
2. Es wurden keine Hinweise auf eine Abhängigkeit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der Cholinesterase-Restaktivität von den Blutgruppen des ABO-Systems und dem Rh-Faktor gefunden.
3. Der Korrelationskoeffizient der Cholinesterase-Ausgangsaktivität / Alter beträgt den nicht signifikant von Null verschiedenen Wert von 0,128. Eine Altersabhängigkeit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität ist damit nicht gesichert. Dieses Ergebnis ist geschlechtsunabhängig.
4. Wie bei der Cholinesterase-Ausgangsaktivität liegen

auch bei der Cholinesterase-Restaktivität nach DFP-Zusatz keine Hinweise auf eine Abhängigkeit von den Blutgruppen des ABO-Systems und dem Rh-Faktor vor.

5. Es besteht eine sehr starke Korrelation der Cholinesterase-Restaktivität mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität. Je größer die Cholinesterase-Ausgangsaktivität ist, umso größer ist die Cholinesterase-Restaktivität.

Dabei besteht ein geringer Geschlechtsunterschied. Bei den Frauen ist der entsprechende Korrelationskoeffizient etwas geringer als bei den Männern.

6. Die Cholinesterase-Aktivitätssenkung ($\text{ChE-AS} = \text{ChE-AA} - \text{ChE-RA}$) korreliert im niedrigeren Bereich der Cholinesterase-Ausgangsaktivität (bis ca. $200 \mu\text{l CO}_2 / 30 \text{ Min.}$) stark mit dieser, im höheren Bereich (über $150 - 200 \mu\text{l CO}_2 / 30 \text{ Min.}$) fast nicht mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität. Der Übergangspunkt vom stark korrelierenden Wertebereich in einen nur noch geringfügig korrelierenden wird bestimmt durch die zugesetzte DFP-Konzentration bei höheren Cholinesterase-Ausgangsaktivitäten und bei niedrigeren DFP-Konzentrationen bei niedrigeren Cholinesterase-Ausgangsaktivitäten. Dies würde bedeuten, daß im Bereich niedrigerer Cholinesterase-Ausgangsaktivitäten (= niedrigere Cholinester-

asen-Konzentration) die zugesetzte DFP-Menge eine fast vollständige Enzymblockierung bewirkt, im höheren Cholinesterase-Ausgangsaktivitätenbereich (= höhere Cholinesterase-Konzentration) ist die durch DFP blockierte Cholinesterase fast konstant und nur abhängig von der zugesetzten DFP-Menge. Daraus läßt sich schließen, daß DFP in der angewandten Konzentration im menschlichen Serum keinem enzymatischen Abbau durch eine "DFP-ase" unterliegt, sondern rasch an Proteine, wie z.B. an Cholinesterase, gebunden wird.

7. Ein Korrelationsvergleich der Cholinesterase-Restaktivität nach Inkubation von Serum mit DFP und mit E 600 mit der Cholinesterase-Ausgangsaktivität zeigt widersprüchliche Ergebnisse:

- a) Beim Vergleich der Korrelationskoeffizienten der Cholinesterase-Restaktivität / Cholinesterase-Ausgangsaktivität, die von der Arb.-Gr. 2 bei Seren. von ein- und denselben Probanden bestimmt wurden, zeigt sich kein prinzipieller Unterschied. Der Korrelationskoeffizient Cholinesterase-Restaktivität (%) / Cholinesterase-Ausgangsaktivität nach Zusatz von E 600 ist zwar mit 0,344 deutlich niedriger als der nach Zusatz von DFP mit 0,562. Doch beide Werte sind signifikant von Null ver-

schieden (siehe Tabelle 9).

- b) Ein Korrelationskoeffizienten-Vergleich der Meßergebnisse, die nach Zusatz von DFP von der Arb.-Gr. 2 und nach Zusatz von E 600 aus der Dissertation von DUMBACH stammen, zeigt jedoch einen deutlichen Unterschied. Während der Korrelationskoeffizient nach Zusatz von DFP je nach Höhe der verwendeten DFP-Konzentration bei den signifikant von Null verschiedenen Werten 0,56 - 0,82 liegt, fand DUMBACH (1976) in seiner statistischen Auswertung nach Zusatz von E 600 den nicht signifikant von Null verschiedenen Wert 0,03 (siehe Tabelle 10). Dies würde nach DFP-Zusatz auf einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Cholinesterase-Restaktivität und der Cholinesterase-Ausgangsaktivität hinweisen, während nach Zusatz von E 600 ein solcher Zusammenhang nach den Ergebnissen von DUMBACH nicht gegeben ist.

E 600 wiederum unterliegt im menschlichen Serum einem gesichert geltenden enzymatischen Abbau. Folgt man nun der Überlegung, daß nach Zusatz von DFP nur ein ähnlicher Koeffizient wie nach Zusatz von E 600 auch beim DFP auf einen enzymatischen Abbau hinweisen würde, dann würde der indirekte Vergleich der Korrelationskoeffizienten auf

keinen enzymatischen Abbau des DFP's schließen lassen.

8. Der Korrelationskoeffizient der Cholinesterase-Restaktivität (%) (nach Zusatz von DFP) zu Para-oxonase-Aktivität, gemessen nach KRISCH, beträgt 0,409 (siehe Tabelle 11). Damit wäre ein Zusammenhang zwischen der Cholinesterase-Restaktivität und der Paraoxonase gegeben.

Literaturverzeichnis

Aldridge W.N.:

Biochem. J. 46: 451 (1950)
zit. n. Aldridge W.N.
Biochem. J. 53: 110 (1953a)

Aldridge W.N.:

Serum esterases. 1. Two types of esterase
(A and B) hydrolysing p-nitrophenyl ace-
tate, propionate and butyrate, and a
method for their determination
Biochem. J. 53: 110 (1953a)

Aldridge W.N.:

Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing
diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600)
and its identity with the A-esterase of
mammalian sera
Biochem J. 53: 117 (1953b)

Anderson, V. and Sölvsten, S:

Esterase activity of leucocyte proteins
and their labelling with radioactive
diisopropylfluorophosphate
Experientia 19: 257 (1953)

Barr, R.D., Ross, S.A.G., McIntosh, J.A. and Williams, J.O.:

Physical influences on the in vitro binding
of di-isopropylfluorophosphate (DF³²P) to
human erythrocytes
Med. Lab. Technol. 32: 41 (1975)

Berends, F., Posthumus, C.H., Sluys, J.v.d. and Deyerkauf, F.A.:

The chemical basis of the "ageing process"
of DFP-inhibited pseudocholinesterase
Biochem. Biophys. Acta 34:576 (1959)

Buddecke, E.:

Grundriß der Biochemie (1970)
Verlag Walter de Gruyter, Berlin

Carson, V.G., Jenden, D.J. and Russel, R.W.:

Changes in peripheral cholinergic systems
following development of tolerance to the
anticholinesterase diisopropylfluorophos-
phat.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 26:39 (1973)

Cohen, J.A., Warringa, M. G.P.J. and Bovens, B.R.:

Protection of true cholinesterase against
diisoprophyl fluorophosphonate by butyryl-
cholin.
Biochem. Biophys. Acta 6:469 (1951)

Cohen J.A. and Warringa, M.G.P.J.:

The fate of P^{32} labelled diisopropyl-
fluorophosphonate in the human body and
its use as a labelling agent in the study
of turnover of blood plasma and red cells.
J. Clin. Invest. 32:459 (1954)

Cohen J. A. and Warringa, M.G.P.J.:

Purification and properties of dialkylfluorophosphatase.

Biochim. Biophys. Acta 26:29 (1957)

Comroe, J.H., Todd, J. and Koelle, G.B.:

The pharmacology of di-isopropylfluorophosphate (DFP) in man

J. Pharmacol. Exper. Therap. 87:281 (1946)

Dettbarn, W.-D. and Hoskin, C.G.:

Toxicity of DFP and related compounds to squids in relation to cholinesterase inhibition and detoxifying enzyme levels.

Bull. Environ Contam. Toxicol 13:133 (1975)

Dixon, M. and Needham, D.M.:

Biochemical research on chemical warfare agents

Nature 158:432 (1946)

Ell, W.:

Diisopropylfluorophosphat und die DFP-ase (E.C.3.8.2.1.)

Dissertation, Erlangen 1978

Erdmann, W.D. and Latki, O.:

Vergiftung mit Diisopropylfluorophosphat (DFP)

Arch. Toxicol. 18:151 (1960)

Forth, W., Henschler, D. und Rummel, W.:

in Allgemeine und Spezielle Pharmakologie
und Toxikologie: Seite 93 ff; Bibliogra-
phisches Institut, Mannheim (1975)

Freedman, A.M. and Himwich, H.E.:

DFP: Site of injection and variation in
response
Am. J. Physiol. 156:125 (1949a)

Freedman, A.M., Willis, A. and Himwich, H.E.:

Correlation between signs of toxicity
and cholinesterase level of brain and
blood during recovery from di-isopropyl-
fluorophosphate (DFP) poisoning
Am. J. Physiol. 157:80 (1949b)

Friedberg, K.D. und Erdmann, W.D.:

Spontane Reaktivierung der durch Alkyl-
phosphate (Paraoxon, Systox, Isostox)
blockierten Cholinesterase in vitro
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path.
Pharmak. 237:1 (1959)

Friedberg, K.D. und Sakai, F.:

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit
Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in
Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines ferment-
reaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-
Methjodid, PAM)
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47:580 (1958)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M. , Baumgartner, W.
Petenyi, M., Burgis, H., Lindorf, H.H., Metzner, H.:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen
Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch
E 600 und Aktivität des E 600-spaltenden
Enzym-Systems in menschlichen Seren.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353, 217 (1972)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Lindorf, H.H., Petenyi, M.,
Flügel, M., Fischer, T., Hiller, T.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der
menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2)
Humangenetik 17, 331 (1973)

Gellman, M.A.:

The use of miotics for the correction
of hypermetropia and accommodative esotropia
Amer. J. Ophthalm. 40:93 (1963)

Gellman, M.A.:

The use of drugs in the diagnosis and
treatment of strabismus
Amer. J. Ophthalm. 41:574 (1964)

Greenberg, H. and Nachmansohn, D.:

Isolation of serine phosphate from the active
site of human prostatic acid phosphatase;
inhibition of the enzyme by DFP
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7:186 (1962)

Grob, D., Harvey, A.M., Langworthy, O.R. and Lilienthal, J.L.jr.:

The administration of di-isopropylfluoro-phosphate (DFP) to man
III. Effect on the central nervous system with special reference to the electrical activity of the brain
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81:257 (1947a)

Grob, D., Lilienthal, J.L., Harvey, A.M. and Jones, B.F.:

The administration of di-isopropyl fluoro-phosphate (DFP) to man
I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase, general systemic effects; use in study of hepatic function and erythropoiesis; and some properties of plasma cholinesterase
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81:217 (1947b)

Hansen, D., Schaum, E. und Wassermann, O.:

Organverteilung und Stoffwechsel von Diisopropylfluoro-phosphat (DFP) beim Meerschweinchen
Arch. Toxikol. 23:73 (1968a)

Hansen, D. Schaum, E. und Wassermann, O.:

Serum level and excretion of diisopropylfluoro-phosphate (DFP) in cats
Biochem. Pharmacol. 17:1159 (1968b)

Harrison, R:

Bilateral lens opacities associated with
use of di-isopropyl fluorophosphate eyedrops.
Mer. J. Ophtal 50:153 (1960)

Harvey, A.M., Lilienthal, J.L. jr., Grob, D., Jones, B.F.
and Talbot, S.A.:

The administration of di-isopropylfluoro-
phosphate to man.

IV The effects on neuromuscular function
in normal subjects and in myasthenia gravis
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81:267 (1947)

Hawkins, R.D. and Mendel, B.:

Selective inhibition of pseudo-cholinesterase
by diisopropyl fluorophosphonate
Brit. J. Pharmacol. 2:173 (1947)

Hermans, G. et Marynen de Preter, L.:

L'emploi d'organophosphates en ophtalmologie
et leur répercussion sur le système enzy-
matique
Acta Anaesthesiol. Belg. 23:122 (1972)

Heymans, C. and Casier, H.:

Inactivation of cholinesterase by di-
isopropylfluorophosphate (DFP) in chronic
experiments
Arch. int. pharmacodyn. 77:64 (1948)

Hjort, P.F., Paputchis, H. and Cheney, B.:

Labelling of red blood cells with radioactive diisopropylfluorophosphate (DFP³²)
evidence for an initial release of label
J. Lab & Clin. Med. 55:416 (1960)

Höllt, V., Mench, W., Schenk, J. and Weger, N.:

Binding of ³H-diisopropylfluorophosphate (DFP) to purified human serum cholinesterase and to rat brain homogenat.
Arch. Pharmacol. 287 Suppl. R 98 (1975)

Hokin, L.E. and Yoda, A.:

Inhibition by diisopropylfluorophosphate of a kidney transport adenosine triphosphatase by phosphorylation of a serinresidue.
Proc. Nat. Acad. Cxi. USA 52:454 (1964)

Hommel, G.:

Estimation of the distribution of a genetically determined enzyme polymorphism by a stochastical outside criterion
Biometr. J. 20, 371 (1978)

Hommel, G. und Koch, D.:

Schaufelprogramm
Programmbibliothek des Instituts für Medizinische Statistik und Dokumentation, Erlangen (1978)

Horton, R.G., Koelle, G.B., Mc Namara, B.P. and Pratt, H.J.:

The acute toxicity of di-isopropyl fluoro-
phosphate

J. Pharmac. Exp. Ther. 87:414 (1946)

Hoskin, F.C.G.:

Di-isopropylphosphorofluoridate and Tabun:
Enzymatic hydrolysis and nerve funktion
science 174:1243 (1971)

Hoskin, F.C.G. and Long, R.J.:

Purification of a DFP-hydrolyzing enzym
from squid head ganglion

Archs Biochem. Biophys. 150:548 (1972)

Hoskin, F.C.G.:

Distribution of diisopropylphosphoro-
fluoridate-hydrolyzing enzym between
sheath and axoplasm of squid giant axon
J. Neurochem. 26:1043 (1976)

Jandorf, B.J. and Mc Namara, P.D.:

Distribution of radiophosphorous in rabbit
tissues after injection of phosphorus-
labelled diisopropylfluorophosphat.

J. Pharmacol. u. Exper. Therap. 98:77 (1950)

Jansen, E.F., Nutting, F., Jang, R. and Balls, A.K.:

Mode of inhibition of chymotrypsin by
diisopropyl fluorophosphate

II Introduction of isopropyl and elimination
of fluorine as hydrogen fluoride

J. Biol. Chem. 185:209 (1950)

Jansz, H.S., Brons, D. and Warringa, M.G.P.J.:

Chemical nature of the DFP-binding site
of pseudocholinesterase
Biochim. Biophys. Acta 34:573 (1959)

Johnson, M.K. and Barnes, J.M.:

Age and the sensibility of chicks to the
delayed neurotoxic effects on some organo-
phosphorus compounds
Biochem. Pharmac. 19:3045 (1970)

Kadin, M.:

Chronic effects of miotic drugs
studies of anticholinesterase activity
and functional adaption to antiglaucoma
drugs
Arch. Euviron. Health 6:736 (1936)

Koelle, G.B. and Gilman, A.:

The relationship between cholinesterase
inhibition and the pharmacological action
of di-isopropyl fluorophosphate (DFP)
J. Phrmacol, u. Exper. Therap. 87:421 (1946a)

Koelle, G.B. and Gilman, A.:

The chronic toxicity of di-isopropyl fluoro-
phosphate (DFP) in dogs, monkeys and rats.
J. Phramcol. & Exper. Therap. 87:435 (1946b)

Krisch, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitro-
phenylphosphat durch menschliches Serum
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6:41 (1968)

Kunkel, H.G. and Ward, S.M.:

Plasma esterase activity in patients with
liver disease and the nephrotic syndrom
Journ. exp. med. 86:325 (1947)

Lange, W. und von Krüger, G.:

Ester der Monofluorphosphorsäure.
Berichte d. dtsh. chem. Gesellschaft 65:1598
(1932)

Latki, O. und Erdmann, W.D.:

Hemmung und Reaktivierung von Cholinester-
asen nach der Vergiftung mit Paraoxon und
DFP in vitro.
Arch. exp. Path. Pharmak. 240:514 (1961)

Leopold, J. H. and Comroe, J.H.jr.:

Use of diisopropyl fluorophosphate ("DFP")
in treatment of glaucoma
Arch Ophth. 36:1 (1946a)

Leopold, J. J. and Comroe, J.H.jr.:

Effect of diisopropyl fluorophosphate
("DFP") in the normal eye
Arch. Ophth. 36:17 (1946b)

Mackworth, J.P.:

unveröffentlichte Arbeit (1942)

zit. n. Modell, W. et al.

J. Pharmacol. u. Exper. Therap. 87:400 (1946)

Main, A.R. and Dauterman, W.C.:

Determination of the bimolecular rate
constant for the reaction between organo-
phosphorus inhibitors and esterases in
the presence of substrat

Nature 198:551 (1963)

Mazur, A.:

An enzym in animal tissues capable of
hydrolyzing the phosphorus-fluorine
bond of alkyl fluorophosphates

J. Biol. Chem. 164:271 (1946)

Mazur, A. and Bodansky, O.:

The mechanism of in vitro and in vivo
inhibition of cholinesterase activity
by diisopropyl fluorophosphate

J. Biol. Chem. 163:261 (1946)

Mc Combie, H. and Saunders, B.C.:

Alkylfluorophosphonates, preparation
and physiological properties

Natur 157:287 (1946)

Modell, W., Krop, S., Hitchcock, P. and Riker, W.F.jr.:

General systemic actions of di-isopropyl
fluorophosphate (DFP) in cats
J. Pharmacol. & Exp. Ther. 87:400 (1946)

Moon, A.Y., Merconroff, J. and Hess, G.P.:

Characterization of a reversibly formed
enzyme complex in the reaction of chymo-
trypsin with diisopropyl fluorophosphate
J. Biol. Chem. 240:717 (1965)

Mounter, L.A.:

Some studies of enzymatic effects of rabbit
serum
J. Biol. Chem. 209:813 (1954)

Mounter, L.A.:

The complex nature of dialkylfluorophos-
phatases of dog and rat liver and kidney
J. Biol. Chem. 215:705 (1955)

Mounter, L.A.:

Dialkylfluorophosphatase of kidney
IV. Dissociation constant of active groups
J. Biol. Chem. 219:677 (1956a)

Mounter, L.A.:

Identity of diisopropylfluorophosphatase
and acylase
Federation Proc. 15:317 (1956)

Mounter, L.A.:

Metabolism of organophosphorus anticholin-
esterase agents
in Handbuch der Experimentellen Pharma-
kologie, herausgegeben von Koelle, G.B.,
Band 15:486, Springer-Verlag, Berlin
Göttingen Heidelberg, (1963)

Mounter, L.A., Alexander, H.C., Tuck, K. D. and Dien, L.T.H.:

The pH dependence and dissociation constants
of esterases and proteases treated with
diisopropyl fluorophosphate
J. Biol. Che. 226:867 (1957)

Mounter, L.A., Baxter, R.F. and Chanutin, A.:

Dialkylfluorophosphatases of microorganisms
J. Biol. Cehm. 215:699 (1955a)

Mounter, L.A. and Chanutin, A.:

Dialkylfluorophosphatase of kidney
II. Studies of activation and inhibition
by metals
J. Biol. Chem. 204:837 (1953a)

Mounter, L.A. and Dien, L.T.H.:

Liberation of hydrofluoric acid by
enzymatic hydrolysis of dialkylfluoro-
phosphates
Proc. Soc. Exp. Biol. 87:40 (1954b)

Mounter, L.A. and Dien, L.T.H.:

Dialkylfluorophosphatase of kidney
V. The hydrolysis of organophosphorus
compounds
J. Biol. Chem. 219:685 (1956)

Mounter, L.A. Dien, L.T.H. and Chanutin, A.:

The distribution of dialkylfluorophosphatases
in the tissues of various species
J. Biol. Chem. 215:691 (1955b)

Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A.:

Dialkylfluorophosphatase of kidney
I. Purification and properties
J. Biol. Chem. 204:221 (1953b)

Munkner, T., Matzke, J. and Videbaek, A.:

Cholinesterase activity of human plasma
after intramuscular diisopropyl fluoro-
phosphonate (DFP)
Acta pharmacol. et toxicol. 18:170 (1961)

Murachi, T.:

A general reaction of diisopropylphosphoro-
fluoridate with proteins without direct
effect on enzymic activities
Biochim. Biophys. Acta 71:239 (1963)

Myers, D.K.:

Competition of the cholinesterase in rat
serum with the pseudo cholinesterase for
diisopropyl fluorophosphonate
Science 115:568 (1952)

Nachmansohn, D. and Feld, E.A.:

Studies on cholinesterase
IV The mechanism of diisopropyl fluoro-
phosphate action in vivo
J. Biol. Chem. 171:715 (1947a)

Nachmansohn, D., Rothenberg, M.A. and Feld, E.A.:

Studies on cholinesterase
V. Kinetics of the enzym inhibition
J. Biol. Chem. 174:247 (1948)

Naess, K.:

The specificity of diisopropylfluorophosphate (DFP)
Acta pharmacol. et toxicol. 12:154 (1956)

Neurath, A.R.:

A component splitting diisopropylfluoro-
phosphate in Sendai and Newcastle disease
virus preparations; its possible identity
with haemolysin
Acta virol. 9:25 (1965)

Nowotny, P., Preußner, S., Konrad, H. and Kiencke, H.:

Granulozytenkinetik mit radioaktivem
Diisopropylfluorophosphat (DF³²P)
Folia haematol. 94:326 (1970)

Ohnesorge, F.K. und v. Kreudenstein, H.S.:

Hemmung der Cholinesterase-Aktivitäten von Erythrozyten, Ventrikelmuskulatur und Gehirn von Meerschweinchen durch subchronische und akute Vergiftung mit Diisopropylphosphorofluoridat (DFP) und ihre Reaktivierbarkeit durch Obidoxim.

Arch. Toxicol. 26:102 (1970)

Oosterbaan, R.A., Kunst, P., v. Rotterdam, J. and Cohen, J.A.:

The reaction of chymotrypsin and diisopropylphosphorofluoridate

II The structure of two DP-substituted peptides from chymotrypsin-DP

Biochim. Biophys. Acta 27:556 (1958)

Quilliam, J.P.:

Di-iso-propylfluorophosphonate (DFP)

Its pharmacology and its therapeutic uses in glaucoma and myasthenia gravis

Post-Grad. M.J. 23:280 (1947)

Ramachandran, B.V.:

Distribution of DF³²P in mouse organs

I. The effect of route of administration on incorporation and toxicity.

Biochem. Pharmac. 15:169 (1966a)

Süllmann, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des
Gewebestoffwechsels
in Lang, K. und Lehnartz, E. Hrgb.:
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-
chemischen Analyse. Bd. IV, Teil a
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York
(1964)

Schrader, G.:

Die Entwicklung neuer insektizider
Phosphorsäure-Ester
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1963)

Victor, N., Hörmann, A., Eder, L.:

Statsys, Beschreibung und Anleitung zur
Benutzung der Programme unter dem Betriebs-
system der Siemens 4004/46, GSF-Bericht MD 24-
München: Gesellschaft für Strahlen- und Umwelt-
forschung mbH (1973)

Walter, E.:

Biomathematik für Mediziner
B.G. Teubner, Stuttgart (1973)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die freundliche Übernahme des Korreferates danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.-Mallinckrodt für die Überlassung des Themas und ihre ebenso freundliche wie hervorragende Betreuung meiner Dissertation.

Ferner bedanke ich mich bei den Herren Prof. Dr. G. Hommel und E. Schmitt für ihre Hilfe bei der Aufstellung und der Auswertung der Computerprogramme.

Mein Dank gilt auch Herrn W. Ell für seine ausgezeichnete Literaturdarstellung der Kenntnisse über DFP und DFP-ase in seiner Dissertation.

LEBENS LAUF

Biographie

Name	Franz Günter Harlander
Geburtstag u. -ort	25.8.1942 in Burghausen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Franz Xaver Harlander, Schlosser Otilie Harlander

Ausbildung und Berufstätigkeit

1948 - 1953	Volksschule Burghausen
1953 - 1956	Realschule Burghausen
1956 - 1960	Chemielaboranten-Lehre Abschluß: Chemielaborant Firma Wacker-Chemie GmbH, Burghausen
1960 - 1964	Chemielaborant Firma Wacker-Chemie GmbH, Burghausen u. Firma Consortium GmbH, München
1962 - 1964	Städtische Abendmittelschule München Abschluß: mittlere Reife
1964 - 1967	Fachhochschule Nürnberg Abschluß: Chemie-Ingenieur (grad.)
1967 - 1972	Chemie-Ingenieur Firma Wacker-Chemie GmbH, Burghausen
1973 - 1978	Studium der Zahnmedizin Universität Erlangen/Nürnberg
22. 12. 1978	Zahnärztliche Prüfung
15. 1. 1979	Bestallung als Zahnarzt
1. 1. 1980 bis jetzt	Zahnarzt-Assistent Praxis Dr. Schech, Herzogenaurach

